UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N°

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le:

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

de l'Université de Paris

par

Pierre DEFRANCE

Pharmacien

DOSAGE DES IMPURETÉS RIBONUCLÉIQUES DANS L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE

INTÉRÊT EN BIOCHIMIE ET EN TOXICOLOGIE

Travail de l'Unité de Biochimie
de l'Institut GUSTAVE-ROUSSY
VILLEJUIF

Jury { MM. TRUHAUT, Président
MALANGEAU, Professeur
PAOLETTI, Maître de Conférences

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N°

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le:

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

de l'Université de Paris

par

Pierre DEFRANCE

Pharmacien

DOSAGE DES IMPURETÉS RIBONUCLÉIQUES DANS L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE

INTÉRÊT EN BIOCHIMIE ET EN TOXICOLOGIE

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Travail de l'Unité de Biochimie
de l'Institut GUSTAVE-ROUSSY
VILLEJUIF

Jury
MM. TRUHAUT, Président
MALANGEAU, Professeur
PAOLETTI, Maître de Conférences

R. BAIN
BIBLIOTHÈQUE
LILLE

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE	- Doyen
	M-M. JANOT	- Assesseur
	L. RODINEAU	- Secrétaire général
	L. JEANDEL	- Secrétaire général adjoint
Mme	S. CERTAIN	- Secrétaire
Mme	M.L. ESPINASSE	- Secrétaire
M.	G. FROISSART	- Secrétaire

DOYEN HONORAIRE

M.	René FABRE	Membre de l'Institut

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	M. DELEPINE	Membre de l'Institut
	L. LAUNOY	
	P. FLEURY	
	M. MASCRE	
	M. PICON	
	C. BEDEL	
	R. FABRE	

PROFESSEURS

MM.	M-M. JANOT	Pharmacie galénique
	G. VALETTE	Pharmacodynamie
	R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale
	M. GUILLOT	Physique
	J. GAUTIER	Chimie organique
Melle	S. LAMBIN	Microbiologie
MM.	Y. RAOUL	Physiologie
	J. COURTOIS	Chimie biologique
	L. DOMANGE	Chimie minérale
	P. CRETE	Botanique
	R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle
	A. MORETTE	Hydrologie
	R. CAVIER	Parasitologie
	A. QUEVAUVILLER	Hygiène et Education sanitaire
	R. MOREAU	Pharmacie chimique
	J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques
	A. GERMAN	Virologie et Sérologie
	M. PIETTE	Biologie sanguine
	P. MALANGEAU	Chimie analytique
	M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise
	G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie

FACULTE DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

-:-:-:

	G, DEYSSON	Cytologie végétale
	J. FLAHAUT	Minéralogie
	C. BOUDENE	Professeur sans chaire
	A. LE HIR	Professeur sans chaire
	J. RENAULT	Professeur sans chaire

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	Y. COHEN	Sciences naturelles
	R. LARUELLE	Physique
	G. LE MOAN	Toxicologie
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
	H. RENAULT	Pharmacie chimique
	C. PAOLETTI	Sciences appliquées
	A. MANGEOT	Chimie analytique
	P. DELAVEAU	Matière médicale
	P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
	J. POISSON	Sciences naturelles
	A. DESVIGNES	Microbiologie
	F. PERCHERON	Biochimie
	J. SAVEL	Sciences naturelles
	J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET	Parasitologie
	P. GESTEAU	Physique biologique
	J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section biologie)
	J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme	J. HUBERT	Microbiologie
MM.	R. LELUC	Microbiologie
	M. LEMONNIER	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Mlle	S. LONGUEVALLE	Service des examens de Chimie
MM.	F. PELLERIN	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
	R. PERLES (F. Fonc.)	Chimie biologique
	J. PESTIS (F. Fonc.)	Biologie animale
	P. POULLAIN	Hématologie
	J. RIVET (F. Fonc.)	Physique
Mme	M. ROBERT	Sérologie
Mlles	A. ROLLEN	Biologie végétale
	L. SEGUIN (F. Fonc.)	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section physico-chimie)
Mme	M. SELLER (F. Fonc.)	Pharmacie galénique industrielle
M.	J. YONGER (F. Fonc.)	Chimie analytique (1ère année)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	A. CAVE	- Chef de travaux de pharmacotechnie galénique
Mlle	H. MORIN	- Chef de travaux de pharmacodynamie
	N	- Chef de travaux de pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Melles	Y. RUYSSEN	- Conservateur, chargée de la Direction
	LAVAUD	- Conservateur
Mmes	DESGRIPPES	- Bibliothécaire
	KREHMER	- Bibliothécaire

A mon Père et à ma Mère,

en témoignage de profonde affection et de gratitude.

A ma Famille,

A mes Amis.

A Monsieur le Professeur R. TRUHAUT,

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène industrielle à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien des Hôpitaux Psychiâtriques de la Seine,

Directeur de l'Unité de Chimiothérapie de l'Institut Gustave-Roussy,

Officier de la Légion d'Honneur,

Aux premières pages de ce travail qu'il nous a fait l'honneur de diriger, nous ne saurions trop lui exprimer nos remerciements pour sa bienveillance et toute la joie que nous avons eue de compter parmi ses élèves.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude pour avoir accepté la présidence de notre jury de thèse.

A Monsieur le Professeur P. MALANGEAU,

Professeur de Chimie Analytique
à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien des Hôpitaux Psychiâtriques
de la Seine,

Témoignage de bien vive reconnaissance
pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter
à ce mémoire, et pour l'honneur qu'il
nous a fait d'accepter de juger notre
thèse.

A Monsieur le Professeur C. PAOLETTI,

Maître de Conférences Agrégé
à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Directeur de l'Unité de Biochimie de
l'Institut Gustave-Roussy,

Pharmacien-Chimiste de 1ère classe de
la Marine,

qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire durant notre service militaire, nous a fait profiter de son enseignement et de son inlassable activité scientifique, a inspiré le sujet de cette thèse et en a guidé la réalisation de ses conseils éclairés,

qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et qu'il soit assuré de notre fidèle amitié.

A Monsieur le Professeur Agrégé P.F. DENOIX

Directeur de l'Institut Gustave-Roussy,

Chirurgien des Hôpitaux de Paris,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui nous a fait l'honneur de nous accueillir à l'Institut GUSTAVE-ROUSSY et nous a permis de réaliser ce travail,

en témoignage de respectueuse gratitude.

A tous nos Maîtres

de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
de Rennes,

Hommage de reconnaissance pour la
qualité de l'enseignement qu'ils nous
ont prodigué.

A Madame N. LAMONTHEZIE,

A Messieurs J.C. REYNOUARD
et P. LESCA,

Avec nos très vifs remerciements pour
l'aide efficace qu'ils nous ont apportée.

A tout le personnel de l'Unité de Biochimie de
l'Institut Gustave-Roussy.

I N T R O D U C T I O N

Après la découverte des nucléoprotéines par MIESCHER dans le pus en 1868, et dans les spermatozoïdes en 1872, ALTMANN décrivit en 1899 la première méthode de préparation des acides nucléiques (AN) débarrassés des protéines. De nombreux auteurs dont KOSSEL, JONES, LEVENE, HAMMARSTEN et GULLAND, étudièrent ensuite leur structure chimique. Le thymus était, alors, la principale source d'AN d'origine animale ; il apparut rapidement que la nature de cet AN différait de celle de l'AN que l'on pouvait extraire de la levure. Mais l'erreur initiale qui faisait concevoir l'acide thymo-nucléique (acide désoxyribonucléique, ADN) comme spécifique des cellules animales, et l'acide zymonucléique (acide ribonucléique, ARN) comme spécifique des cellules végétales ne tarda pas à être corrigée. La présence d'ARN dans les tissus animaux et inversement d'ADN dans les tissus végétaux fut rapidement démontrée.

Cette notion de coexistence des deux types d'AN dans les tissus vivants devait, par la suite, être étendue à l'échelle de la cellule. Les ADN ne sont localisés que dans le noyau ; les ARN se retrouvent surtout dans le cytoplasme et, plus particulièrement, dans les ribosomes, granulations visibles au microscope électronique, et aussi dans le noyau au niveau du nucléole.

En fait, la localisation différentielle des deux AN n'est pas aussi nette ; leur structure chimique très voisine leur permet, en effet, de s'associer ou même de s'imbriquer. Ainsi, on est parvenu récemment à isoler des enzymes qui assurent in vitro l'incorporation des ribonucléotides dans les positions terminales de l'ADN ; mais, l'imbrication des deux AN devient encore plus évidente au cours de la synthèse enzymatique de l'ARN dont la répartition des bases est assurée par l'ADN. Ce rôle de "moule" ("template" pour les Anglo-Saxons) que remplit l'ADN a conduit MONOD et JACOB à concevoir un ARN qui, synthétisé au contact de l'ADN, serait chargé de transmettre aux ribosomes le message génétique qu'il a reçu. Cette biosynthèse de l'ARN "messager" serait ainsi précédée de la formation d'un polymère mixte dont la très courte existence ne semble pas devoir modifier la répartition cellulaire des AN.

La présence des deux AN, au sein même de la cellule, rend difficile leur extraction sélective. Il est cependant nécessaire dans de nombreuses expériences de nature physico-chimiques (mesure des caractéristiques moléculaires) ou biologiques (mise en évidence d'un pouvoir infectieux) de connaître l'importance de ces contaminations ou même d'obtenir l'un des AN totalement débarrassé de désoxyribonucléotides ou de ribonucléotides.

En effet, un ADN biologiquement actif extrait, soit de bactériophages, soit de virus en culture sur tissus animaux, est noyé dans une masse d'ADN inactif provenant des cellules-hôtes. De nombreuses impuretés dont l'ARN se retrouvent avec cet ADN, même dans le cas de virus à ADN.

D'autre part, il a été démontré que de nombreux ADN viraux sont également doués d'un pouvoir biologique spécifique, même à l'état de traces ; il importe donc de prouver que l'activité biologique observée après l'action d'un ADN ne dépend en aucune façon d'une impureté ribonucléique. L'étude analytique de la contamination des ADN par l'ARN présente une importance notable et fait l'objet du présent travail.

Afin de mieux situer ce problème purement analytique que constitue le dosage de faibles quantités d'ARN dans l'ADN, nous avons effectué, dans une première partie, un bref rappel de nos connaissances dans le domaine de la structure, de l'extraction et de l'analyse des AN.

Dans une seconde partie, nous présenterons et discuterons tout d'abord, l'ensemble des procédés qui permettent la caractérisation et le dosage de l'ADN et de l'ARN, en décrivant de façon très détaillée les deux techniques le plus souvent retenues : orcinol chlorhydrique catalysé par le cuivre pour l'ARN, diphénylamine sulfurique catalysée par l'acétaldéhyde pour l'ADN.

Une troisième partie sera consacrée à l'essentiel de nos recherches expérimentales qui nous ont permis de préciser les modalités des dosages de l'ARN dans l'ADN ; dosage soit direct, soit après séparation hydrolytique (et éventuellement concentration de la fraction ARN) selon le principe de la technique d'enrichissement couramment utilisée en toxicologie.

En conclusion, nous nous efforcerons de dégager brièvement l'intérêt de ces recherches en insistant sur l'utilité en biochimie d'une parfaite connaissance de la composition des AN et d'un strict contrôle des substances qui peuvent les contaminer.

PREMIERE PARTIE

- - - -

STRUCTURE, EXTRACTION et ANALYSE

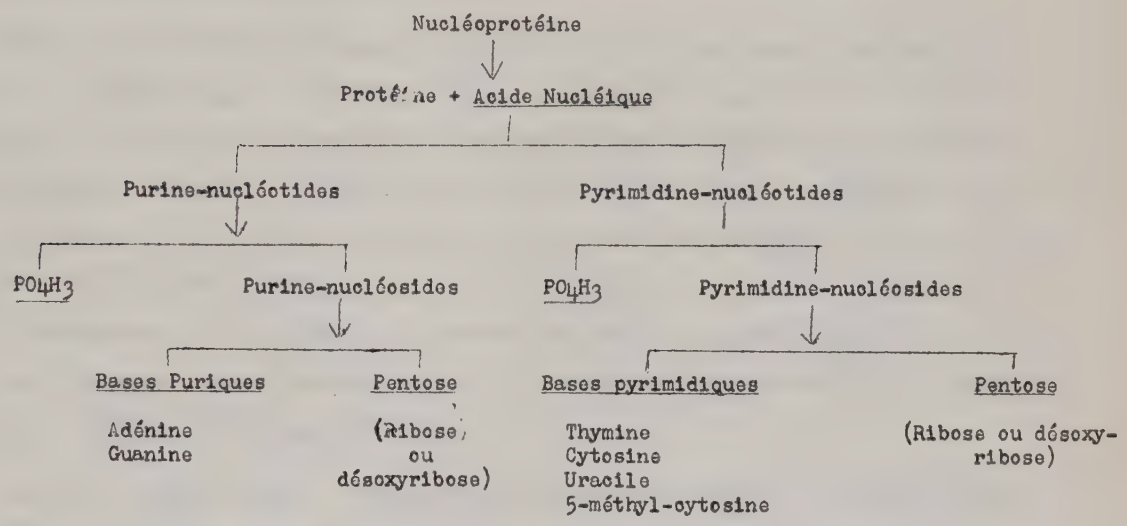
des ACIDES NUCLEIQUES

* * * * * * * * *

A - GENERALITES SUR LA STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES -

Les nucléoprotéines (NP) sont des composants universels de la matière vivante ; elles donnent, par dissociation, une fraction holo-protéinique, protamine ou histone selon le cas, et une fraction non protéinique dite acide nucléique. Cet acide fournit, par hydrolyse totale des bases azotées, de l'acide phosphorique et un pentose qui peut être le ribose ou le désoxyribose ; selon le cas, il s'agit de l'acide ribonucléique (ARN) ou de l'acide désoxyribonucléique (ADN) auxquels correspondent les ribonucléoprotéines (RNP) et les désoxyribonucléoprotéines (DNP).

L'hydrolyse totale des NP se déroule selon le schéma :



Le pentose de l'ARN de levure, isolé à l'état de cristaux par LEVENE et JACOBS en 1909, présentant des constantes physiques différentes de celles des pentoses connus à cette époque (L-arabinose, D-xylose et D-lyxose) reçut la dénomination de "ribose" rappelant ainsi dans ses deux premières lettres les initiales du lieu de sa découverte : le Rockefeller Institute. En 1947, BARKER, FARRAR et GULLAND (9) prouvèrent de façon incontestable la nature de ce pentose en convertissant l'acide aldonique du sucre obtenu par l'hydrolyse des nucléotides puriques de l'ARN de levure, en benziminazole correspondant, facilement identifiable.

Lorsque partant du fait que le pentose de l'ADN de thymus ne pouvait former en présence de benzylphénylhydrazine qu'une benzylphénylhydrazone et non l'osazone correspondante, LEVENE et MORI montrèrent que cet ose était un 2-désoxyaldose, il devenait relativement facile de préciser duquel des deux désoxypentose existants il s'agissait. En effet, l'isomérie stéréochimique des pentoses introduite par les fonctions alcools secondaires montre qu'aux quatre pentoses de la série D ne peuvent correspondre que deux sucres 2 D-désoxypentoses : le désoxyribose et le désoxylose dérivant, le premier du ribose et de l'arabinose, et le second du xylose et du lyxose.

Le désoxypentose de l'ADN de thymus, ayant en valeur absolue le pouvoir rotatoire du L-2-désoxyribose mais de signe contraire, s'avérait être le D-2-désoxyribose. Le benzylmercaptal du D-2-désoxyribose isolé récemment par KENT (96) en hydrolysant l'ADN en présence d'α thiotoluène, ne laisse subsister aucun doute sur la nature de ce sucre.

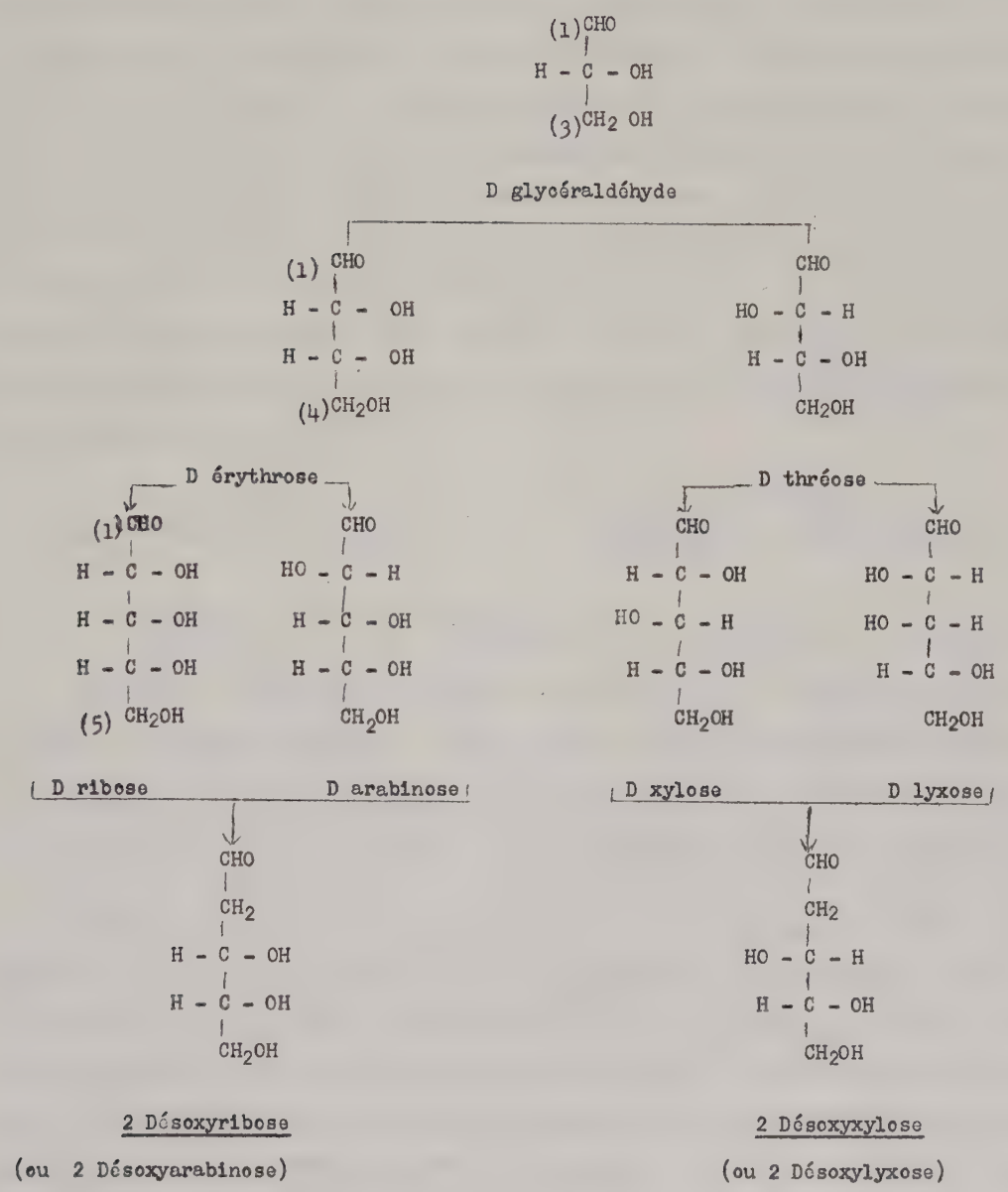
Cette isomérie stéréochimique apparaît dès le glycéraldéhyde dont le carbone 2, asymétrique, permet une double représentation de cette molécule : la forme D, où, selon une convention proposée par E. FISCHER et maintenant universellement adoptée, l'hydroxyle de la fonction alcool secondaire est situé à droite de la ligne de projection des atomes de carbones (Tableau I) et la forme L où ce même hydroxyle est situé à gauche. Le nombre d'isomères possible augmente avec le nombre d'atomes de carbone asymétriques ; c'est ainsi que dérivent par allongement de la chaîne du D glycéraldéhyde, deux D tétroses et quatre D pentoses (Tableau I).

Pour tous ces aldoses, l'atome de carbone asymétrique le plus éloigné de la fonction aldéhyde présente la même configuration que celui du D glycéraldéhyde. A cette série D appartiennent la plupart des oses naturels.

A l'isomérie stéréochimique des pentoses due à la répartition différente des groupements -OH sur les carbones asymétriques 3 et 4 s'ajoute l'isomérie introduite par la fonction carbonylée -CHO. En effet, par suite d'un blocage partiel de la fonction aldéhyde, il se forme une liaison semi-acétal entre l'aldéhyde et la fonction alcool du carbone 4, le carbone 1 devient asymétrique entraînant la formation de deux isomères alpha et bêta dont la structure stéréochimique rappelle le furane : ce sont, pour le ribose, l'alpha et le bêta-ribofuranose et pour le désoxyribose, l'alpha et le bêta désoxyribofuranose.

- T A B L E A U I -

CONFIGURATION DES D aldothréoses, aldotétroses, aldopentoses et aldodésoxypentoses -



2 Désoxyribose

(ou 2 Désoxyarabinose)

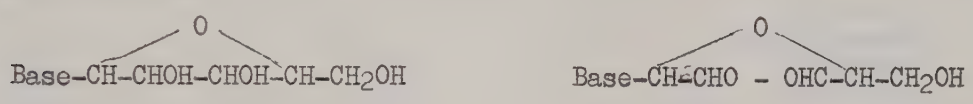
2 Désoxyxylose

(ou 2 Désoxylyxose)

C'est sous cette forme furanique que les sucres sont présents dans les AN.

Dans les AN, le ribose et le désoxyribose sont liés à des bases azotées au nombre de 13 dans la matière vivante mais dont les cinq plus répandues dans les tissus animaux sont représentés dans le tableau II.

La condensation du ribose ou du désoxyribose avec l'une des bases précédentes engendre un nucléoside dont les propriétés réductrices n'apparaissent qu'après hydrolyse, il s'agit donc d'un glucoside. La méthylation, l'interaction avec le chlorure de triphénylméthane et l'oxydation périodique de nucléosides ont permis de mettre en évidence la structure bêta furanique des pentoses dans les ribo et les désoxyribonucléosides : la méthylation de l'adénosine (riboside de l'adénine) entraîne la formation du 2,3,5 triméthyl-D-ribofuranose (108), le chlorure de triphénylméthane formant un éther de préférence avec les fonctions alcool primaire implique la forme furanique du ribose et du désoxyribose (20), enfin l'oxydation périodique des ribonucléosides, contrairement à celle des désoxyribonucléosides donne un dialdéhyde selon la réaction suivante (163) :



Ces diverses réactions confirment que les nucléosides sont des furanosides.

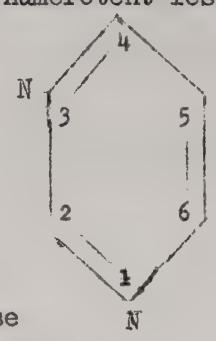
Lors de l'étude des liaisons osidiques avec les bases puriques et pyrimidiques, il apparut certain, tout d'abord, que les groupements aminés ne pouvaient être le point de fixation des pentoses car la désamination oxydative par l'acide nitreux ne libérait pas les sucres. Seuls les atomes d'azote pouvaient alors permettre cette liaison. La méthylation de l'uridine (riboside de l'uracile) entraînant par hydrolyse la formation du N_1 méthyl-uracile (109) devait permettre de conclure que les nucléosides pyrimidiques étaient des N_3 furanosides. La fixation des sucres sur l'un des quatre atomes N des bases puriques fut tour à tour envisagée par GULLAND et ses collaborateurs en comparant les spectres d'absorption en lumière ultraviolette des nucléosides et des dérivés méthylés correspondants, le groupement méthyle occupant successivement les positions possibles du sucre ; il est apparu que la fixation de l'ose sur N_9 était la règle pour les ribo et les désoxyribonucléosides puriques (113, 163).

- TABLEAU II -

PRINCIPALES BASES AZOTEES DES ACIDES NUCLEIQUES TROUVEES DANS LES TISSUS ANIMAUX

NOYAU	SUBSTITUTIONS	R_2	R_5	R_6	BASES: Dans ADN et ARN	BASES: Dans ADN seulement	BASES: Dans ARN seulement
Purine				NH_2	Adénine (6-aminopurine)		
		NH_2		OH	Guanine (2-amino-6-hydroxypurine)		
Pyrimidine (*)				NH_2	Cytosine (2-hydroxy-6-aminopyrimidine)		
				OH			Uracile (2-6-dihydroxypyrimidine)
			CH_3	OH		Thymine (5-méthyluracile)	

(*) Certains auteurs, se référant aux Chemical Abstracts, numérotent les sommets de ce cycle de la façon suivante



Nous préférons l'autre système, plus ancien, qui laisse subsister une analogie entre bases puriques et pyrimidiques.

L'analyse aux rayons X a confirmé ces structures nucléosidiques et a permis d'établir que les cycles plans des noyaux puriques et pyrimidiques étaient perpendiculaires au plan du sucre (70) (Voir figure 1 ci-dessous).

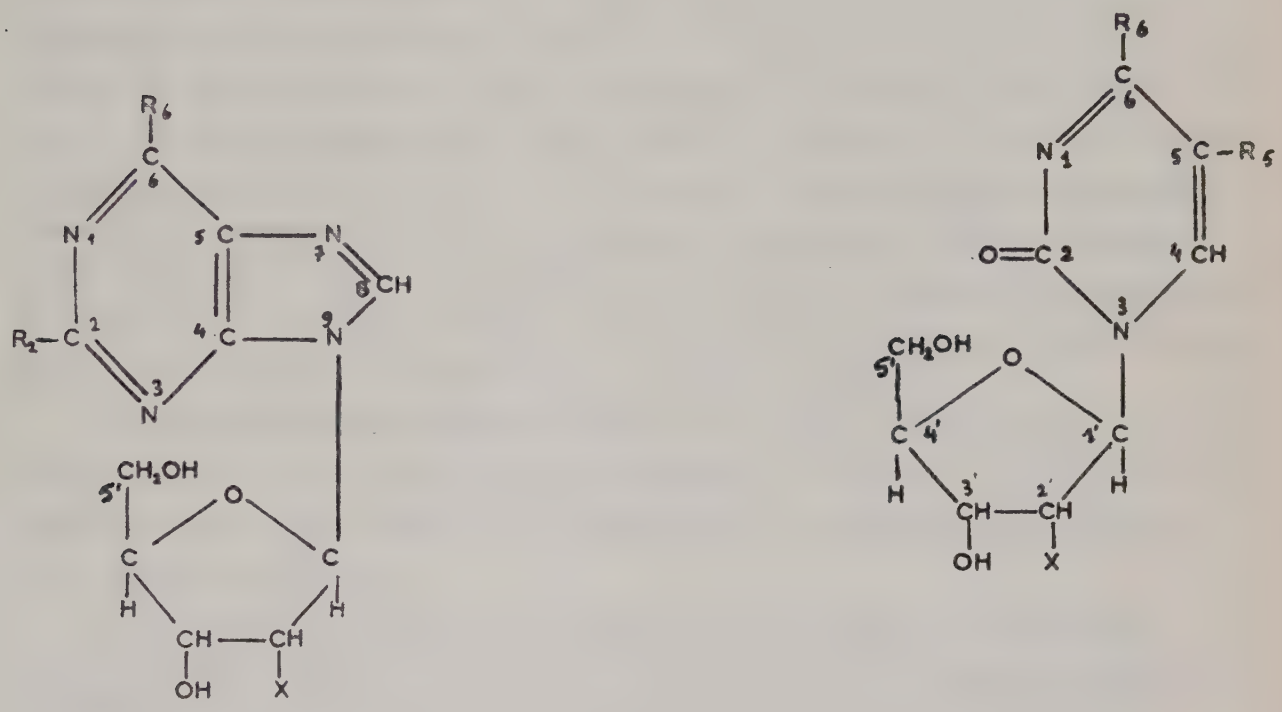


figure 1 : FORMULES DEVELOPPEES DES NUCLEOSIDES

Pour la signification des radicaux R_2, R_5, R_6, voir le Tableau II page 8.

X doit être remplacé par H ou OH selon qu'il s'agit d'un ribo ou d'un désoxyribonucléoside.

Le numéro indiquant la position des atomes de carbone dans la fraction osidique de la molécule porte un "prime" pour éviter de les confondre avec les atomes de carbone de la base.

Cinq nucléosides dérivent des bases principales (adénine, guanine, cytosine, uracile et thymine) ; ce sont : l'adénosine-bêta-D-ribofuranosidoadénine), la guanosine (9-bêta-D-ribofuranosidoguanine), la cytidine (3-bêta-D-ribofuranosido-uracile), et la thymidine (3-bêta-D-2' désoxyribofuranosidothymine). Il existe évidemment, correspondant à l'adénosine, la guanosine et la cytidine, les composés où le bêta-D-2' désoxyribofuranose remplace le bêta-D-ribofuranose.

Les nucléotides sont des esters phosphoriques des nucléosides. La nomenclature des ribo et des désoxyribonucléotides, appelés parfois ribotides et désoxyribotides, est assez complexe car, en plus de la présence du ribose ou du désoxyribose, on doit mentionner le point de fixation de la molécule d'acide phosphorique. Cette liaison phospho-ester peut, en effet, se faire en 5' ou 3' s'il s'agit d'un désoxyriboside et en 5' 3' ou 2' s'il s'agit d'un riboside ; à l'adénosine, par exemple, correspondent trois nucléotides monophosphates (AMP) : l'adénosine 5' phosphate, l'adénosine 3' phosphate et l'adénosine 2' phosphate. Les nucléosides 5' phosphate par fixation en 5' d'une ou deux nouvelles molécules d'acide phosphorique peuvent former des nucléosides di- ou triphosphates.

Il existe également une pseudo-uridine où la liaison ribose-uracile se fait, non plus à partir de N_3 mais de C_5. Cette liaison est donc C-C et non plus N-C. La pseudo-uridine se trouve dans l'ARN cytoplasmique de transfert, dit ARN soluble des organismes supérieurs.

En définitive, la nomenclature habituellement retenue est la suivante : le nucléoside étant figuré par son initiale A,G,C,U ou T, AMP désignera l'adénosine-monophosphate, ADP l'adénosine-diphosphate, ATP l'adénosine-triohosphate.

Les désoxyribonucléotides correspondant aux trois premiers ribonucléotides précédents reçoivent le même symbole que ceux-ci, la lettre d le précédant ; par exemple, on écrira dAMP ou dGMP, etc...

La terminologie précédente sous-entend que le (ou les) groupement (s) phosphate (s) sont fixés en position 5'. S'il en est autrement (position 3' ou 2' pour les ribotides et position 3' pour les désoxyribotides), on indique cette position par le chiffre correspondant ; on aura ainsi, par exemple, l'AMP-2', TMP-3', dCPD-3' .....

Enfin, AMP, GMP, CMP, UMP et TMP portent aussi le nom d'acides adénylique, guanylique, cytidylique, uridylique et thymidylique. Les nucléotides existent à l'état libre dans la matière vivante et sont utilisés comme précurseurs des acides nucléiques lors de leur biosynthèse.

Les résultats de l'électrotitration des monoribonucléotides et des acides ribo et désoxyribonucléiques amenèrent LEVENE et SIMMS (107) à concevoir les AN comme des polynucléotides (figure 2) résultant de la condensation d'un grand nombre de nucléosides monophosphates unis entre eux par des liaisons phosphodiesters et pouvant être représentés ainsi :

```
          |
Base - sucre - PO(OH)
               |
       Base  - sucre - PO(OH)
                       |
                Base - sucre - PO(OH)
                               |
```

Plus récemment, certains auteurs ont interprété différemment les résultats d'électrotitration des AN en y voyant des liaisons internucléotidiques du type phosphotriesters qui entraînent nécessairement la ramification suivante des chaînes polynucléotidiques (62) (106) :

```
          |
Base - sucre - PO(OH)        PO(OH)2
               |             |
       Base - sucre - PO - sucre - Base
                       |
                Base - sucre - PO(OH)2
```

Cette hypothèse inapplicable à la structure actuelle de l'ADN pourrait peut-être expliquer les ramifications possibles de l'ARN, mais il est vraisemblable que le groupement triester observé par FLETCHER et Coll. (62) soit un artefact dû à la dégradation de l'AN au cours de sa préparation.

La liaison internucléotidique étant une liaison phosphodiester établie entre deux groupements hydroxyles des sucres de deux nucléotides voisins, il y a six possibilités théoriques pour ces liaisons. Le ribose sous sa forme furanique possède, en effet, trois groupements -OH susceptibles d'entrer dans des liaisons esters et placés sur les atomes de carbone 2', 3' et 5' (figure 1 page 9) pouvant ainsi permettre les liaisons phosphodiesters du type 5' - 5', 3' - 3', 2' - 2', 3' - 5', 2' - 3' et 2' - 5'.

Certaines de ces possibilités ont dû être éliminées à la suite des travaux de BROWN et TODD (25) sur l'hydrolyse alcaline de l'ARN et ceux de COHN et VOLKIN (36) sur la dégradation enzymatique de ce même polynucléotide.

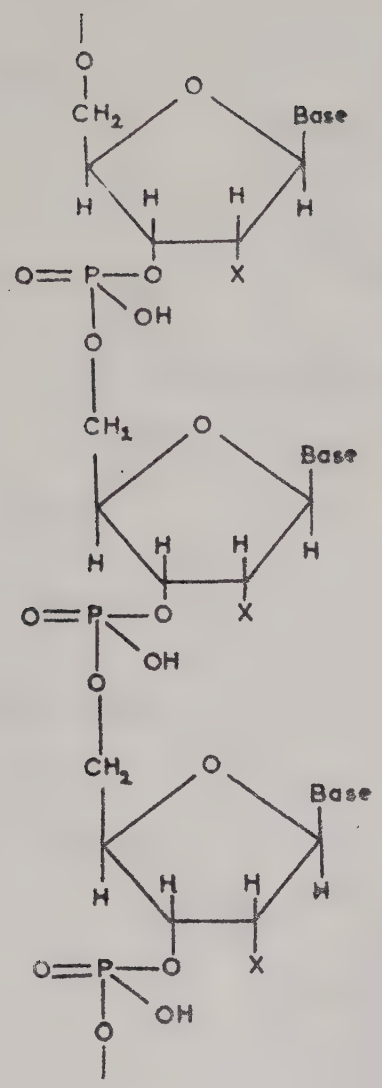


Figure 2 :
FORMULE DEVELOPPEE
D'UN POLYNUCLEOTIDE

La dégradation alcaline de l'ARN se traduit par la formation, dans une première étape de liaisons internucléotidiques triphosphates dues à l'estérification complémentaire d'un des deux groupements hydroxyles resté libre sur le carbone 2' ou 3' du sucre. L'instabilité de cette structure conduit rapidement à la libération de nucléosides cycliques 2' - 3' phosphates qui donnent à leur tour en présence d'alcali, un mélange de nucléosides 3' et 2' phosphates (figure 3 page 13) (25).

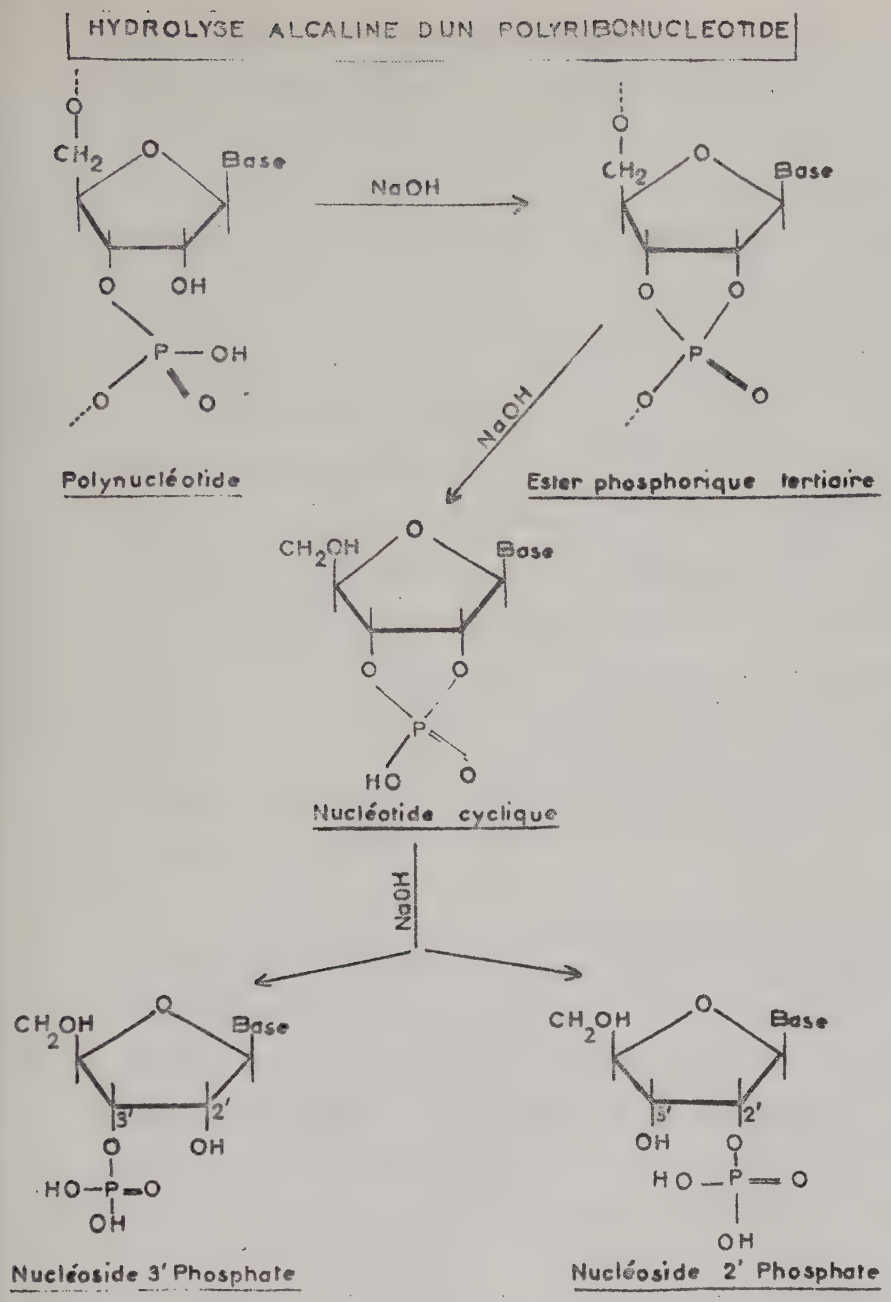


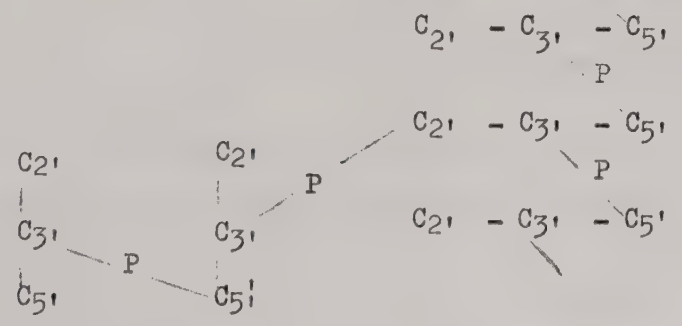
Figure 3

Il apparaît donc que l'hydrolyse alcaline d'un phosphodiester est facilitée par la présence d'un groupement OH à proximité du groupement phosphoryl, ce qui explique également la stabilité de l'ADN en milieu alcalin. Il semble, d'autre part, que le carbone 2' ou 3' ou, peut-être, les deux, interviennent dans les liaisons internucléotidiques qui pourraient être 3'-5', 2'-5', ou 5'-5', les liaisons 2'-2', 3'-3' et 2'-3' devant être éliminées à la suite de la dégradation enzymatique de l'ARN par la phosphodiestérase du venin de serpent qui provoque la formation des quatre nucléosides -5'-phosphate : l'adénosine, la guanine, l'uridine, et la cytidine 5' phosphate (36). Ces nucléotides identiques aux nucléosides 5' phosphate de synthèse confirment l'intervention du carbone 5' dans la liaison internucléotidique mais une liaison du type 5'-5' est impossible du fait de la stabilité des dinucléotides synthétiques ($_{5'}$-O-P-O-C_5, en milieu alcalin)(54).

D'autre part, la ribonucléase pancréatique hydrolyse l'ARN selon un mécanisme semblable à l'hydrolyse alcaline (fig.3 page 13) avec formation de l'ester cyclique intermédiaire 2'-3' phosphate. Des deux liaisons intermédiaires restant possibles pour l'ARN 2'-5' ou 3'-5', BROWN et TODD (25) postulèrent la liaison phosphodiester 3'-5' d'abord par analogie, à l'ADN où la liaison 2'-5' est impossible, puis, après action d'une nucléase, sur les esters phosphobenzyliques synthétiques. Cette nucléase extraite de la rate convertit, en effet, l'adénosine 3' benzylphosphate et la cytidine 3' benzylphosphate en acide adénylique (adénine 3' phosphate) et en acide cytidilique (cytidine 3' phosphate) tandis que les esters 2' benzylphosphates ne sont pas attaqués ; contrairement à la ribonucléase qui n'hydrolyse pas complètement l'ARN en mononucléotides (il se forme des mononucléotides pyrimidiques et des oligonucléotides composés de nucléotides puriques avec un nucléotide pyrimidique terminal) (117), cette enzyme scinde 90 p.cent de l'ARN en mononucléotides dont l'adénosine et la guanine 3' phosphate (24) ; la liaison internucléotidique dans les ARN concerne donc le C_3 et non le C_2 , des nucléotides puriques et pyrimidiques, c'est-à-dire que la liaison phosphodiester s'établit entre le carbone 3' de l'un des sucres et le carbone 5' de l'autre (figure 2, page 12).

La preuve irréfutable de ce type de liaison résulte de l'action d'une phosphomonoestérase sur les dinucléotides résultant de l'action toujours incomplète de la RNase (nucléosides puriques liés par le $C_{2'}$ ou 3' au C5' d'un nucléotide pyrimidique par une liaison phosphodiester) : il se forme, en effet, un dinucléoside monophosphate puis finalement un nucléoside 3' phosphate. La liaison à l'intérieur de ce dinucléotide est donc bien du type 3'-5'.

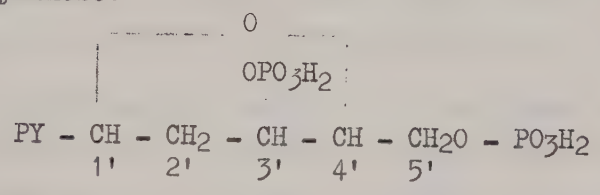
Ceci n'exclut pas la possibilité de chaînes latérales où les liaisons internucléotidiques seraient également du type 3'-5', la ramification se faisant soit par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester (voir p.11) soit par fixation sur le $C_{2'}$ d'un des nucléosides de la chaîne principale comme le montre le schéma de BROWN et TODD (25) :



- P représente la molécule d'acide phosphorique, et $C_{2'}$ -$C_{3'}$ -$C_{5'}$ le nucléoside. -

Bien que cette structure ramifiée de l'ARN ait été mise en évidence de différentes façons (3) (36), l'opinion générale est actuellement opposée à l'existence, dans les tissus, de chaînes secondaires en quantités appréciables et l'on considère les ARN comme étant constitués d'un enchaînement de nucléotides (fig.2 page 12).

La position des points de liaison internucléotidiques des ADN a été résolue plus facilement que pour les ARN puisque seuls les deux groupements OH libres en 3' et 5' pouvaient entrer dans une liaison internucléotidique du type phosphodiester. On a montré qu'il en était bien ainsi : tout d'abord la titration électromagnétique indiquait que le sucre ne possédait pas de groupements hydroxyles libres ; d'autre part, DEKKER, MICHELSON et TODD (40) ont isolé des hydrolysats acides des ADN de sperme de hareng, la thymidine 3'-5' diphosphates et la désoxycytidine 3'-5' diphosphates et ont établi leur structure en les comparant aux produits de synthèse.

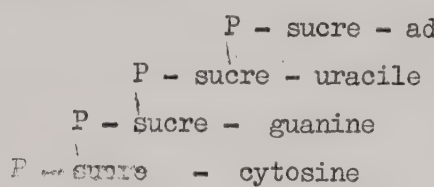


L'hydrolyse chimique des ADN n'est pas une méthode satisfaisante pour obtenir des mononucléotides du fait que les liens glucosidiques des désoxyribonucléotides puriques sont très labiles en milieu acide et que le groupe diester phosphorique résiste aux hydrolyses alcalines.

Par contre, KLEIN et THANNHAUSER ont isolé à partir d'ADN traité par une phosphatase alcaline, dont l'activité phosphomonoestérasique était inhibée par l'arsenic, les acides désoxyadénylique, déspxyguanylique, désoxycytidylique et thymidylique estérifiés en 5' par PO_4H_3. La liaison internucléotidique est donc bien dans l'ADN du type 3'-5' phosphate ($C_{3'}$ - P - $C_{5'}$).

L'existence de chaînes polymérisées nucléiques pose le problème de la séquence dans laquelle sont intégrés les différents nucléotides dans la molécule nucléique et celui de leur configuration spatiale dont dépend une partie de l'activité biologique de la molécule.

Les premiers travaux de LEVENE et JONES suggéraient que l'ARN de levure était composé de quatre nucléotides différents,la molécule d'acide nucléique formant le tetranucléotide suivant :



Par analogie, cette conception fut étendue à l'ADN qui contenait, croyait-on, les quatre bases, adénine, guanine, cytosine, et thymine, en quantités égales. Par la suite, lorsque furent obtenus des acides nucléiques de poids moléculaires extrêmement élevés, on considéra l'acide nucléique comme étant formé d'un enchaînement de tetranucléotides, chaque tetranucléotide possédant 2 nucléotides puriques et 2 nucléotides pyrimidiques.

Mais ELSON et CHARGAFF (55) ont montré que cette hypothèse qui faisait du tetranucléotide l'unité fondamentale des AN était erronée. Par analyse chromatographique, ils ont pu, en effet, établir que les proportions molaires des bases sont variables selon l'origine des AN qu'il s'agisse de l'ARN ou de l'ADN. Par exemple, pour les ADN le rapport A + T / G + C varie de 0,4 à 1,9 - or, la structure tetranucléotidique impliquant que les différentes bases sont en quantités équimolaires, le rapport devrait être égal à 1-. Il ne semble donc pas y avoir dans les AN d'autre unité fondamentale que le mononucléotide.

Les proportions molaires relatives des bases de l'ARN provenant de différentes sources varient largement d'un ARN à l'autre mais ELSON et CHARGAFF (55) ont fait remarquer que le nombre de nucléotides portant un groupement aminé en position 6 (dans l'adénine et la cytosine) est égal au nombre de nucléotides ayant un groupement 6 hexo dans la guanine et l'uracile.

Une telle symétrie se retrouve également dans l'ADN où l'analyse chromatographique a montré que, lorsqu'ils provenaient de différents organes d'un même animal, ou de différentes sources d'une même espèce microbienne, les proportions entre les bases étaient sensiblement les mêmes. Ainsi, dans toutes les préparations d'ADN, les rapports $\frac{A + G}{T + C}$, $\frac{A}{T}$ et $\frac{G}{C}$ sont toujours proches de l'unité.

Il existe donc une équimolarité entre les bases puriques et pyrimidiques, compatible avec un accouplement selon les paires adénine-thymine et guanine-cytosine.

On peut distinguer deux types d'ADN : le premier type correspondant aux ADN de tissus animaux et végétaux est le type A - T dans lequel l'adénine et la thymine prédominent, le second rencontré chez les microorganismes étant le type G - C où prédominent la guanine et la cytosine.

Les mesures d'électro-titrations (80) ont montré que les groupes CO et NH_2 des bases sont, contrairement aux groupements phosphates, inaccessibles à la titration, même en solution aqueuse. Cette constatation peut rendre compte de la présence de liaisons hydrogène entre les bases.

Les méthodes de diffraction des rayons X employées initialement par ASTBURY et plus récemment par FRANKLIN et GOSLING (65) ont permis de préciser la structure fine de la molécule d'ADN dont la configuration en double hélice, le diamètre de cette hélice (17 Å) ainsi que la masse par unité de longueur (200/Å). De telles investigations ont montré que l'ADN selon sa teneur en eau peut se présenter sous trois formes différentes dont deux fréquentes : la forme resserrée A correspondant à une teneur en eau d'environ 40 p. cent et d'apparence cristalline, et la forme B plus allongée dont la structure est paracristalline. Dans la forme B, dont la teneur en eau est plus élevée, les nucléotides sont disposés perpendiculairement à l'axe de la fibre et arrangés les uns au dessus des autres avec un espacement de 3,4 Å. La période selon l'axe de la fibre, c'est à dire la distance à laquelle on retrouve une disposition identique des atomes est de 34 Å.

Les observations au microscope électronique et les mesures de viscosité et de diffusion de la lumière ont permis de concevoir la molécule d'ADN comme un long filament ondulé de plusieurs milliers d'angstroms de long (6 à 7000 Å).

En 1953, WATSON et CRICK (169) se sont basés sur ces données pour proposer un schéma de structure représenté sur la fig.4, page 18). La molécule d'ADN est formée de deux chaînes polynucléotidiques unies l'une à l'autre et s'enroulant en hélice autour d'un axe commun, l'union entre les chaînes se fait par des liaisons hydrogène entre l'adénine et la thymine ou vice-versa d'une part et la guanine et la cytosine ou vice-versa de l'autre (fig.5, page 19). En conséquence, l'ordre dans lequel se trouvent les bases dans une chaîne détermine automatiquement l'ordre dans l'autre chaîne qui lui est complémentaire et la séquence des atomes dans l'une des chaînes phosphate-sucre est en direction opposée à la séquence correspondante dans l'autre chaîne. Pour cette dernière raison, les deux chaînes polynucléotidiques représentant l'ADN sont dites parfois "antiparallèles".

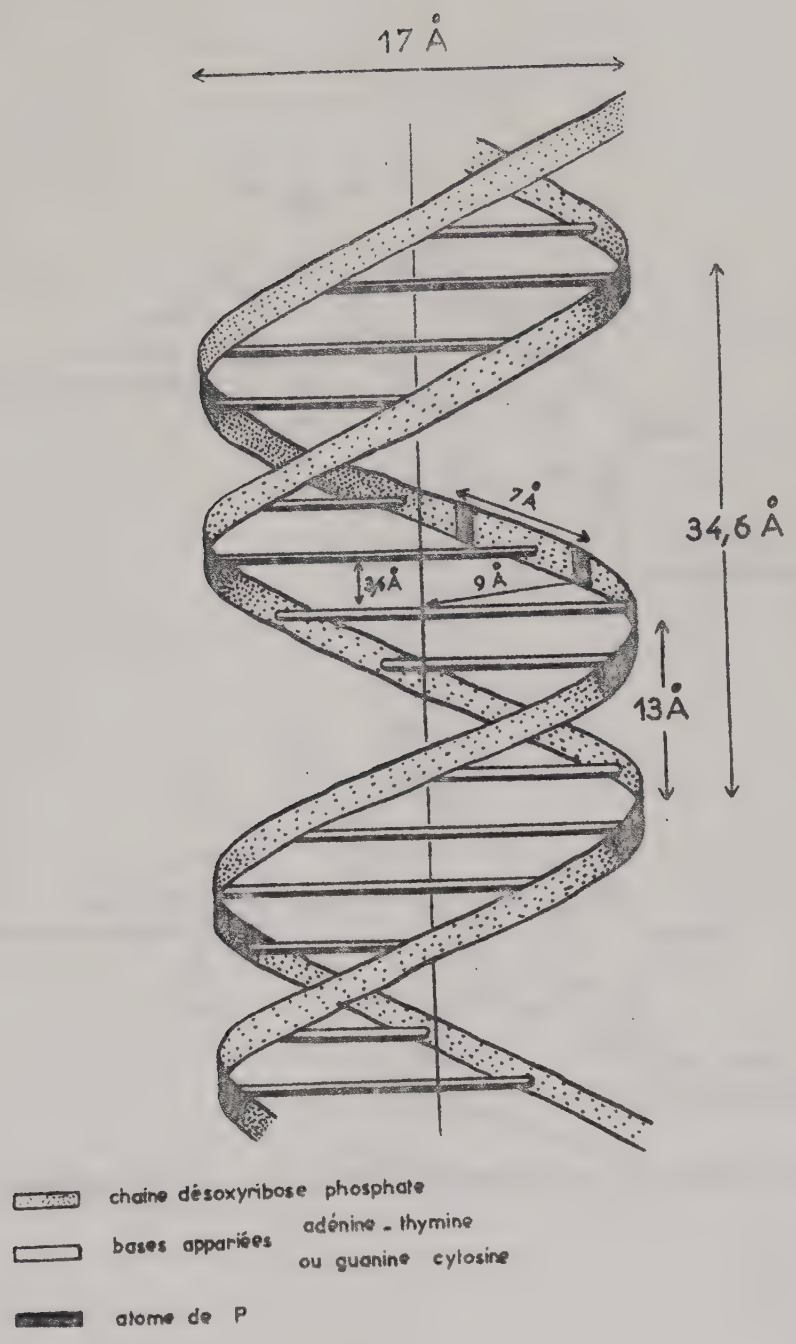
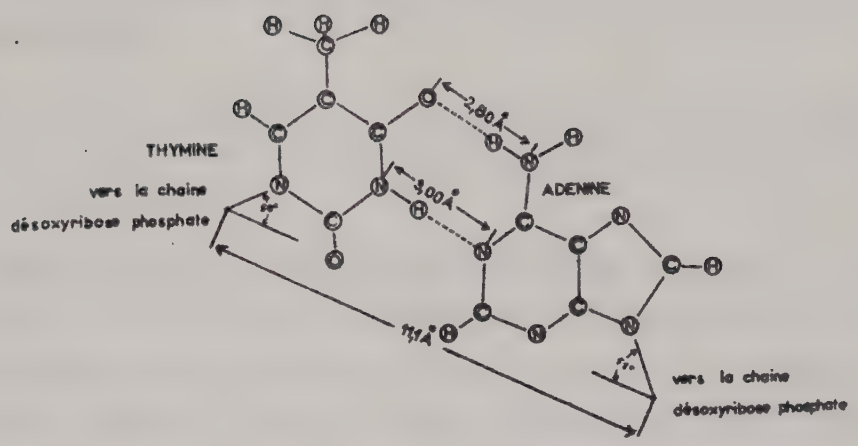
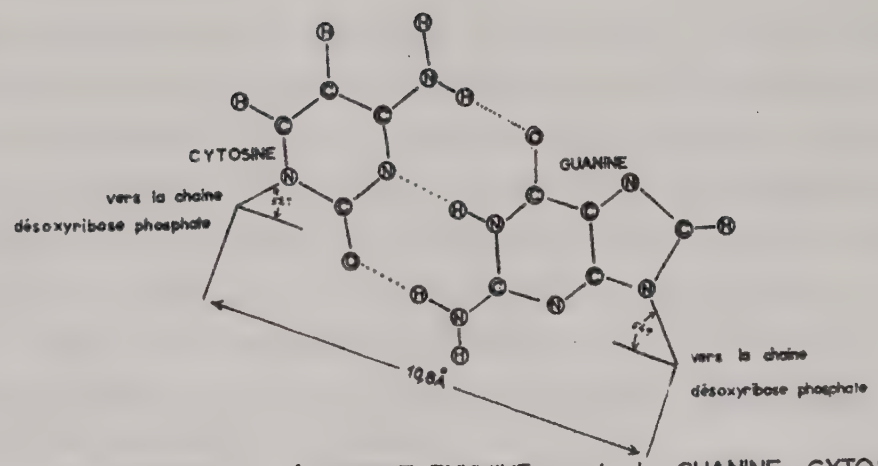


Figure 4

Schéma de la structure bihélicoïdale de l'ADN
selon WATSON et CRICK (169)





APPARIEMENT de L'ADENINE-THYMINE et de la GUANINE-CYTOSINE

Figure 5

Les bases accouplées sont disposées perpendiculairement à l'axe de la fibre ainsi que les liaisons glycosidiques entre les sucres et les bases. Le plan des cycles de désoxyribose est parallèle à l'axe ; le pas de l'hélice est de 34 Å et il y a dix nucléotides par tour ; les atomes phosphates sont distants de 9 Å de l'axe de la fibre dont le diamètre est de 17 Å. Cette structure en double hélice est généralement admise pour tous les ADN à l'exception de ceux du virus du polyome et du bactériophage Φ X 174 dont la structure serait monohélicoïdale.

L'ADN ne se trouve que dans le noyau des cellules ; son poids moléculaire (PM) est généralement de l'ordre de 6.10^6 ce qui correspond à l'assemblage d'environ 25 000 nucléotides.

La structure de l'ARN n'est pas aussi déterminée que celle de l'ADN ; elle dépend de l'origine et de la localisation intracellulaire de cet AN.

Les ARN nucléaires et mitochondriaux ne constituent qu'une faible fraction de l'ARN total ; cependant, leur rôle dans l'économie cellulaire paraît fondamental ; par contre, l'ARN ribosomal (*) représente de 50 à 80 p.cent de l'ARN total des cellules.

Dans le cytoplasme, existe également un ARN dit ARN soluble ou ARN de transfert, de bas poids moléculaire, se retrouvant dans la fraction dite pH 5 obtenue par précipitation à ce pH du surnageant cytoplasmique de l'ultracentrifugation des cellules ; l'ARN soluble est capable de se combiner aux acides aminés activés et de les transporter vers les lieux de la synthèse protéique.

Enfin, on a mis récemment en évidence un ARN dit "messager" qui aurait pour rôle de transmettre l'information génétique fournie par l'ADN aux lieux de la synthèse protéique. Son renouvellement serait très rapide et son PM s'élèverait à quelques centaines de mille.

La différence essentielle entre l'ARN de transfert et les autres ARN cellulaires réside dans le PM et par conséquent, dans le nombre de nucléotides constituant chacun de ses polymères. Le PM de l'ARN de transfert varie de 15000 à 30000, cet ARN contient de 50 à 100 nucléotides ; le PM des autres ARN se situe entre 500 000 et 2 000 000 ; il correspond à un assemblage de 1500 à 6000 nucléotides.

(*) Les ribosomes sont des granulations cytoplasmiques de 20 millimicrons environ, incluses dans le réticulum endocytoplasmique ou ergastoplasme. Les microsomes sont des ribosomes non complètement débarrassés de restes ergastoplasmiques.

Il semble les ARN soient constitués principalement d'un enchaînement linéaire de nucléotides, le quart de la molécule seulement se présentant dans les tissus sous forme bihélicoïdale.

Des structures en hélice sont en effet probables et elles s'observent sur les polymères d'acide adénylique ou uridylique obtenus après action synthètisante de la polynucléotide phosporylase de S. OCHOA et Mme GRUNBERG-MANAGO (110). Depuis, de nombreux auteurs ont suggéré une structure mono et même bihélicoïdale pour l'ARN.

Ayant obtenu pour l'ARN soluble d'Eschérichia coli un diagramme de rayons X semblable à celui correspondant à la configuration B de l'ARN, FULLER (69) proposa un modèle de structure se rapprochant le plus possible du schéma de WATSON et CRICK et dans lequel des liaisons hydrogène s'établissent entre l'adénine et l'uracile, d'une part, et la guanine et la cytosine de l'autre.

En fait, la configuration spatiale de l'ARN n'est pas entièrement élucidée et l'on pense actuellement que les ARN en solution sont constitués d'une seule longue chaîne due à la répétition du motif ribose-phosphate. Cette chaîne n'est pas ramifiée ; dans un milieu de faible force ionique, les charges négatives dues aux fonctions acides non neutralisées peuvent interagir, il en résulte des répulsions et une extension de la molécule que l'on peut mesurer après photographie au microscope électronique : ses dimensions se situent aux environs de 200 à 2000 Å pour la longueur, 10 à 13 Å pour le diamètre ; inversement, à force ionique moyenne ou élevée, la chaîne nucléique s'enroule sur elle-même et forme une pelote.

B - GENERALITES SUR LES METHODES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

L'extraction des AN peut être entreprise dans le but, soit d'obtenir ces substances aussi proches que possible de leur état naturel, soit de déterminer leur taux dans un milieu donné.

Dans le premier cas, il importe de maintenir tout au long de la préparation l'intégrité des molécules nucléiques, parfois au détriment du rendement ;

dans l'autre, au contraire, il est nécessaire d'effectuer une récupération complète de certains constituants nucléiques (phosphore, sucre, bases ou nucléotides) au détriment des structures moléculaires inévitablement altérées.

I - METHODES DE PREPARATION DES AN -

Le premier groupe de méthodes nécessite de nombreuses précautions pour obtenir des AN dont l'arrangement spatial soit entièrement respecté.

Il importe, tout d'abord, d'empêcher toute action des nucléases abondamment représentées dans les tissus animaux, car il semble, par analogie avec ce que l'on sait sur les ADN bactériens transformants et les ARN viraux infectieux, que l'action biologique d'un AN nécessite que soit conservé, dans sa quasi-totalité, l'enchaînement nucléotidique.

Cette dégradation enzymatique plus ou moins marquée est évitée par abaissement de la température, la précipitation immédiate des enzymes nucléasiques en même temps que la majeure partie des protéines, ou l'utilisation d'inhibiteur d'enzymes tels que les arséniates, les citrates, les fluorures ou certains agents complexants comme l'acide éthylène-diamine tétracétique et ses sels ; ces agents complexants empêchent l'activation naturelle des enzymes par des traces d'éléments métalliques.

Pour la première fois dans l'histoire de la biochimie extractive, on a eu affaire avec les AN à des polymères de PM très élevé et, par conséquent, à des molécules très longues : on peut ainsi estimer, pour un ADN intracellulaire, que cette longueur est de l'ordre du micron, c'est à dire comparable au diamètre des bactéries courantes, pour une largeur qui n'excède pas 2/1000 de micron ; dans ces conditions, on conçoit aisément que les molécules d'ADN soient très sensibles aux agents mécaniques. Cette fragilité des AN rend nécessaire d'éviter tout broyage trop prolongé ou trop violent des tissus, toute agitation trop intense des solutions, toute surpression hydrodynamique (passage forcé à travers des seringues, pression exagérée sur des colonnes de chromatographie).

Malgré ces précautions, il semble d'ailleurs que les méthodes habituelles de la biochimie ne permettent pas d'obtenir des AN, et spécialement des ADN, dont le PM corresponde à celui des AN natifs. On expliquerait ainsi pourquoi le PM des ADN oscille souvent d'un échantillon à l'autre selon les expérimenta-

tions ; le PM le plus fréquemment rencontré (6 à 8.10^6) ne représenterait, peut-être, qu'un artefact de préparation d'une substance de PM en réalité plus élevé (140 millions dans le cas des bactériophages). Cette fragilité mécanique pourrait, peut-être, aussi expliquer la faible activité biologique des AN isolés en comparaison à leur activité "in situ".

Les techniques d'extraction des AN doivent, en pratique, être adaptées à chaque espèce animale, à l'intérieur d'une même espèce animale à chaque tissu, et pour chaque tissu aux différentes qualités d'AN recherchées.

Cependant, le principe général de ces différentes méthodes de préparation reste le même ; il consiste, tout d'abord, à séparer les nucléoprotéines (NP) puis à rompre l'association naturelle acide nucléique-protéine par des agents déprotéinisants dont la diversité conduit à la mise au point de nombreuses méthodes d'extraction (figure 6, ci-dessous).

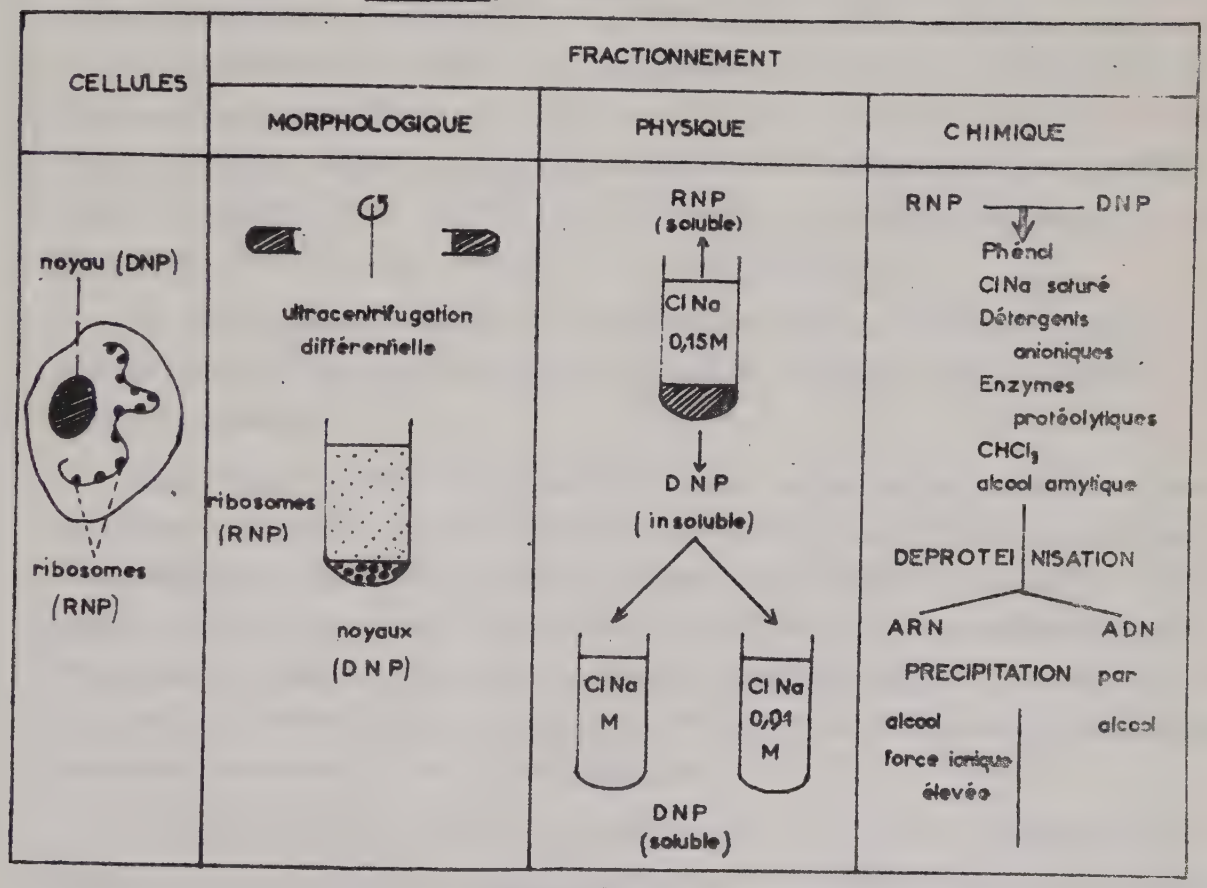


Figure 6

Schéma des préparations des Nucléoprotéines et des Acides Nucléiques.

1° - Préparation des acides désoxyribonucléiques

Quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, la préparation de l'ADN à partir de tissus animaux comporte généralement les étapes suivantes :

- Rupture des membranes cellulaires
- Purification des DNP, notamment par élimination des RNP et de l'ARN
- Mise en solution des DNP
- Dissociation des DNP et élimination des protéines
- Purification et, souvent, précipitation de l'ADN

Les principales méthodes décrites dans la littérature (67, 68, 73, 93, 98,, 99, 103, 118, 131) suivent toutes ce schéma général mais certaines étapes peuvent être confondues.

La rupture des cellules s'effectue, par broyage mécanique ou désintégration aux ultra-sons, en présence de ClNa citrate 0,14 M.

Les broyats de tissus, ainsi obtenus, sont centrifugés et les surnageants contenant les RNP sont éliminés : les RNP sont, en effet, solubles dans des solutions de ClNa 0,14 M, tandis que les DNP ne le sont que dans des solutions très peu concentrées (molarité inférieure à 0,01 M) ou, au contraire, de concentration égale ou supérieure à la molarité. Cette extraction des RNP par ClNa 0,14 M est généralement répétée cinq à six fois ; de nombreuses impuretés solubles ainsi que 80 p. cent de l'ARN sont ainsi éliminés.

Le culot résultant des centrifugations précédentes contient les débris cellulaires et les DNP qui sont mises en solution, soit dans l'eau distillée, soit dans ClNa M ou 2M.

Dans l'eau, les DNP ont tendance à former un gel qui se solubilise après une longue agitation, laissant semble-t-il, intacte leur structure moléculaire sous réserve que dans ces conditions les nucléases restent très actives ; inversement, la mise en solution des NP dans des milieux de force ionique élevée s'accompagne d'une dissociation du complexe nucléoprotéique : l'apport de ClNa, augmentant la force ionique, réduit, en effet, les interactions électrostatiques entre les protéines et les acides nucléiques.

L'élimination des protéines peut se faire par la suite ; cependant, dans quelques cas, ces deux stades sont confondus, la dissociation des NP s'accompagnant de la précipitation ou de la solubilisation des protéines. Les méthodes de déprotéinisation des NP les plus utilisées font état de l'emploi de milieux

salins, de concentration élevée, des détergents, du chloroforme, du phénol, ou d'enzymes protéolytiques. Tout en respectant les AN, elles permettent d'éliminer les protéines d'une solution en n'y laissant que des réactifs facilement éliminables, soit directement par dialyse ou par solution, soit indirectement par précipitation de l'AN au dernier stade des opérations.

a) - Déprotéinisation par les sels

Selon la technique de SIGNER et SCHWANDER (149) la solution de DNP est saturée en ClNa par addition de cristaux, convenablement agitée et abandonnée au minimum quinze jours à trois semaines en chambre froide. Après filtration sur célite, l'ADN est précipité du filtrat par l'alcool. La précipitation des protéines après dissociation des NP ne s'effectue que très lentement. La précipitation des protamines est plus rapide que celle des histones ; c'est ainsi qu'EMMANUEL et CHAIKOFF (56) préparent de l'ADN de sperme de saumon en 10 heures ; une telle rapidité d'action est cependant exceptionnelle.

Le rendement en ADN ne dépasse pas 1,5 p. cent du poids de l'organe pour le thymus de veau.

b) - Déprotéinisation par les détergents

Les détergents les plus utilisés sont le xylène sulfonate de sodium (150) et surtout le dodécyl-sulfate de sodium (lauryl sulfate de Na) (49, 118). Dans la technique de KAY, SIMMONS et DOUNCE (93), le dodécyl-sulfate de Na est ajouté à la solution des DNP dans ClNa 0,01 M. Après agitation douce pendant 16 heures, la solution est amenée à concentration molaire en ClNa puis centrifugée ; l'addition de Cl Na favorise le relargage du complexe dodécylsulfate-protéine et la précipitation de l'ADN par l'éthanol. Les fibres obtenues sont dissoutes dans ClNa 0,01 M et traitées une nouvelle fois par le dodécyl sulfate de Na ; l'ADN précipité par l'alcool en milieu ClNa M est redissous puis reprécipité définitivement.

Ces méthodes de préparation de l'ADN sont, à l'heure actuelle, parmi les plus satisfaisantes ; leur rendement élevé n'altère nullement la pureté des ADN qui se montrent souvent biologiquement actifs.

c) - Déprotéinisation par le chloroforme (67, 79)

L'hétéropolarité des protéines explique le rôle déprotéinisant du chloroforme : la partie lipophile de la protéine s'orientant dans la phase orga-

nique et la partie hydrophile dans l'eau, les protéines se retrouvent, après centrifugation, sous forme de précipité à l'interface des phases eau-chloroforme. Il est nécessaire de répéter plusieurs fois le traitement de la phase aqueuse pour obtenir une déprotéinisation totale.

Cette méthode permet d'obtenir un ADN purifié et biologiquement actif (68) ; le produit final renferme, en général, moins de 0,1 p. cent de protéines, mais le rendement est très faible, la plus grande partie de l'ADN restant fixée sur la protéine dénaturée.

d) - Déprotéinisation par le phénol

A partir d'une suspension tissulaire, le mélange phénol-eau à pH acide libère l'ADN dans la phase aqueuse alors qu'il insolubilise les DNP et les protéines. Cependant, l'introduction d'acide para-aminosalicylique (PAS) dans la phase aqueuse - technique de KIRBY (99) - ou l'utilisation du mélange phénol-eau à pH alcalin permet le passage d'une partie ou de la totalité de l'ADN dans la phase aqueuse.

GEORGIEV (73) et LITTAUER, dans un premier temps, éliminent l'ARN en traitant les tissus par une solution de phénol à pH 6, puis extraient ensuite l'ADN par une solution de phénol en milieu alcalin. Le rendement de la préparation étant faible, LAMONTHEZIE et coll. (103) préfèrent éliminer au préalable les RNP par dissolution dans ClNa 0,14 M, avant le traitement par une solution de phénol à pH 9 ; cette méthode fournit rapidement avec un rendement satisfaisant, un ADN de bonne qualité, biologiquement actif et ne contenant que des traces d'ARN.

e) - Déprotéinisation par les enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques utilisées sont la chymotrypsine, la trypsine et la papaïne.

BUTLER et coll. (27) traitent la solution de DNP dans ClNa 1,7 M, amenée à un pH voisin de 7,6 par la chymotrypsine, et précipitent l'ADN par l'alcool.

Récemment, PAOLETTI et coll. (132) ont mis au point une méthode permettant l'attaque directe de tissus par la papaïne et l'obtention de l'ADN sans passer par le stade DNP ; en présence d'acide cholique, l'action de la papaïne est complète après 8 heures à 45° C.

2° - Préparation des acides ribonucléiques

Les méthodes les plus anciennes consistent à extraire les RNP par une solution de ClNa 0,14 M - citrate Na 0,05 M, à les précipiter à pH 4,3, à les remettre en solution, puis à les déprotéiniser par divers procédés, notamment le ClNa à différentes concentrations ou les détergents.

L'extraction, par GIERER et SCHRAMM (75) (76) d'un ARN infectieux par addition de phénol saturé d'eau à une suspension de virus de la mosaïque de tabac dans un tampon phosphate, a permis d'établir de nouvelles méthodes de préparation où l'on renonce à isoler dans un premier temps les RNP ; les tissus homogénéisés sont traités par le phénol, soit d'emblée, soit après action d'un agent déprotéinisant.

Ainsi,HALL et DOTY (83), dans leur méthode de préparation de l'ARN à partir de ribosomes de foie de veau, font agir le laurylsulfate de sodium avant l'addition du phénol. LASKOV et coll. (105), pour leur part, homogénéisent directement le foie dans un mélange à parties égales d'EDTA 10^{-4}M pH 8 et de phénol fraichement distillé saturé d'eau ; après centrifugation, l'ARN est présent dans la phase surnageante aqueuse tandis que la phase phénolique contient les protéines et les débris cellulaires.

Selon que l'ARN est précipité de la phase aqueuse par l'alcool, le sulfate d'ammonium ou le chlorure de sodium, ses caractéristiques physiques varient ; c'est ainsi que les sels précipitent principalement les ARN de haut poids moléculaire.

II - METHODES D'EXTRACTION DES AN EN VUE DE LEUR DOSAGE -

Les méthodes d'extraction, à des fins analytiques, doivent assurer la récupération complète de certains constituants nucléiques (phosphore, sucre, bases ou nucléotides) dont le dosage permet d'établir la teneur en AN des tissus. Quelque soit le procédé d'extraction, il n'épargne pas la structure de l'AN qui est, généralement, complètement dégradé et n'a donc aucun point commun avec les méthodes de préparation des AN précédemment décrites qui ont pour but d'obtenir un AN aussi "natif" que possible, souvent au détriment du rendement.

Tout tissu , avant l'extraction proprement dite des AN, subit un traitement préliminaire dans le but d'éliminer les nombreuses substances susceptibles d'interférer dans les réactions de dosage des constituants nucléiques.

1° - Traitement préliminaire des tissus

Le tissu finement divisé est épuisé à froid par l'acide trichloracétique (ATC) à 10 p.cent ou l'acide perchlorique (APC) à 4,5 p. cent qui extrait ce qu'on appelle communément "la fraction acido-soluble" c'est à dire, les ortophosphates, les polyphosphates, de nombreux composés de bas PM et notamment, des composés à structure purique ou pyrimidique, tels certains coenzymes (DPN et TPN), l'adénosine et ses dérivés, AMP, ADP et surtout ATP, et les nucléotides précurseurs des AN.

Le résidu du lavage par ATC ou APC est délipidé par plusieurs traitements à l'alcool à 95° qui se font tout d'abord à la température ambiante puis au bain marie à 75° C. On pratique ensuite deux extractions par l'éther à 30° C et on laisse sécher la poudre, soit à l'air, soit dans une étuve. Cette poudre délipidée et privée d'une partie des phosphoprotéines contient les AN que l'on extrait selon les techniques de SCHNEIDER, d'OGUR et ROSEN ou de SCHMIDT-THANNHAUSER.

2° - Principes des méthodes d'extraction

Elles consistent toutes à 'hydroliser les AN en milieu acide ou alcalin dans le but de les extraire globalement ou de les obtenir séparément.

a) - Technique de SCHNEIDER (143)

L'hydrolyse globale de l'ARN et de l'ADN est effectuée sur la poudre sèche délipidée, soit par APC 0,5 N, 20 minutes à 70° C, soit par ATC 5 p.cent, 15 minutes à 90° C.

Seules les réactions spécifiques des sucres permettent l'évaluation quantitative de chacun des AN dans cet hydrolysat unique. Mais, l'ADN interférant dans la plupart des réactions colorées du ribose, l'emploi de cette technique d'extraction reste très aléatoire.

b) - Technique d'OGUR et ROSEN (129)

La poudre sèche délipidée est traitée à 4° C par APC N pendant 18 heures ; dans ces conditions, seul l'ARN est hydrolysé. L'ADN est ensuite dégradé par le même acide employé, cette fois à chaud, 70° C pendant 15 minutes.

Cette hydrolyse différentielle permet d'effectuer sur chaque hydrolysat une détermination analytique spécifique.

La séparation des deux AN selon ce procédé n'est malheureusement pas complète : l'ARN, en effet, n'est pas totalement hydrolysé tandis que de nombreux ADN sont sensibles à l'action prolongée des acides, même à froid.

La technique d'OGUR et ROSEN a surtout été utilisée pour l'extraction des AN de tissus végétaux.

c) - Technique de SCHMIDT-THANNHAUSER (141)

1- Principe

Son principe est identique à celui de la technique d'OGUR et ROSEN ; mais, cette fois, l'hydrolyse différentielle se fait en milieu alcalin.

L'ARN est très sensible à l'action prolongée des alcalis ; traité par la soude N, il est totalement hydrolisé à l'état de monoribonucléotides (32) qui ne précipitent plus en milieu acide. Par contre, l'ADN, dans les mêmes conditions, n'est que partiellement dégradé à l'état de polydésoxyribonucléotides de PM relativement élevé, précipitables quantitativement par les acides concentrés à froid ; cette précipitation qui permet d'éliminer l'ARN entraîne, parallèlement à l'ADN, de nombreuses protéines. Une hydrolyse de ce précipité en milieu acide à chaud permet alors d'obtenir les constituants désoxyribonucléiques dégradés à l'exclusion des protéines qui restent sous forme de précipité. Le mécanisme de l'action de la soude sur l'ARN a été décrit précédemment (Ière partie Page 13, figure 3).

2- Mode opératoire

La poudre sèche délipidée est traitée par HOK 0,5 N à 37° C pendant 16 à 18 heures. Après refroidissement, l'ADN et les protéines sont précipitées par APC 2,5 N ; le liquide surnageant contient les nucléotides de l'ARN et le phosphore protéinique que l'on sépare par fixation des ribonucléotides sur charbon activé, après neutralisation du surnageant par HOK 2N ; il se forme alors un abondant précipité de perchlorate de K que l'on élimine par centrifugation. On procéde ensuite à l'élution des ribonucléotides par passage sur la colonne d'un mélange alcool-ammoniaque.

Le culot d'hydrolyse de l'ARN contenant de l'ADN et les protéines, est lavé par APC 0,5 N à 0°C pour éliminer les traces d'ARN non hydrolysé et les ribonucléotides ; l'ADN est ensuite hydrolysé par APC 0,5 N à 70°C pendant 20 minutes.

3- Limites d'utilisation de la technique de SCHMIDT-THANNHAUSER.

Il est indispensable de prendre certaines précautions pour éviter la contamination mutuelle des fractions ARN et ADN, qui résulte généralement de l'hydrolyse prématurée des AN ou de l'hydrolyse incomplète de l'ARN.

Au cours de l'extraction des "acido-solubles", l'ADN, par suite de la fragilité des liaisons purine-désoxyribose en milieu acide, peut former, dans certaines conditions, ce qu'il est convenu d'appeler l'acide "apurinique. Cet acide s'hydrolysant dans les mêmes conditions que l'ARN, la fraction ribonucléique est alors sérieusement contaminée tandis que la fraction désoxyribonucléique est appauvrie. Cette hydrolyse prématurée de l'ADN peut être évitée en faisant agir rapidement et à froid un acide (ATC ou APC) dont le titre n'est pas trop élevé.

D'autre part, l'hydrolyse alcaline de l'ARN peut être incomplète si la quantité de soude ou de potasse utilisée est insuffisante. Il est donc essentiel que l'alcali soit en quantité telle qu'il n'y ait pas de variations notables de pH au cours de l'hydrolyse, sinon la fraction ADN serait contaminée par l'ARN.

L'importance de la contamination de l'ARN par le phosphore phosphoprotéinique varie selon les tissus ; elle peut se situer aux environs de 25 p. 100 pour le foie et s'élever jusqu'à 60 p. 100 pour les tissus nerveux. La fraction ADN peut être aussi légèrement contaminée par des traces de phosphore étranger ; en général, cette contamination est peu gênante pour les dosages chimiques, puisqu'elle ne représente que 1 à 2 p. 100 du phosphore total. Il semble, néanmoins, préférable de contrôler le dosage du phosphore ribonucléique ou désoxyribonucléique par le dosage colorimétrique des sucres ou le dosage spectrophotométrique des bases. Il importe cependant de mentionner que de nombreux produits de dégradation venant des protéines perturbent notablement les mesures de densité optique à 260 millimicrons.

C - GENERALITES SUR LES METHODES D'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

Il est nécessaire d'effectuer sur ces AN diverses analyses d'ordre physique, chimique et physico-chimique. La recherche des substances contaminantes telles les protéines, le phosphore inorganique, l'ARN dans l'ADN et l'ADN dans l'ARN, s'effectue par des méthodes chimiques tandis que l'on contrôle l'état de polymérisation des AN par les techniques physiques comme la spectrophotométrie ultraviolette, la viscosimétrie, la biréfringence d'écoulement, la diffusion de la lumière ; la détermination de la composition en bases ou en nucléotides des AN fait appel, pour sa part, à des techniques physiques (sédimentation par ultracentrifugation) ou physico-chimiques (chromatographie et électrophorèse).

I- ANALYSE CHIMIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES -

Les acides nucléiques se prêtent à de nombreuses déterminations chimiques; les plus importantes sont, d'une part, le dosage de l'azote, du phosphore, de l'eau et des pentoses, et de l'autre la recherche et le dosage des impuretés : les protéines, l'ADN et les produits de dégradation dans l'ARN et inversement l'ARN et ses produits de dégradation dans l'ADN.

L'étude de ce dernier mode de contamination de l'ADN constitue avec le dosage des pentoses l'essentiel de nos recherches expérimentales qui seront exposées dans la seconde et la troisième partie de cette étude.

Le dosage de l'azote et du phosphore s'effectue après minéralisation des AN en présence de perhydrol. Quelques heures suffisent pour transformer le phosphore des groupements phosphodiesters en phosphates tandis que la minéralisation de l'azote intracyclique des noyaux puriques et pyrimidiques est toujours laborieuse. Il est, ainsi, difficile d'effectuer une minéralisation commune aux deux dosages ; une attaque de longue durée risque, en effet, de provoquer une perte de phosphore ; une minéralisation trop brève pourrait, inversement, entraîner une importante erreur par défaut dans le dosage de l'azote.

La technique de dosage du phosphore sera décrite dans la seconde partie de ce travail. Par ailleurs, le dosage de l'azote est effectué par volumétrie selon la technique classique de KJELDHAL.

- TABLEAU III -

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DES ARN UTILISES

NATURE ET ORIGINE de l'ARN	MODE d'EXTRACTION	P	N	N/P	Protéines	ε (P)	HYPERCHROMICITE par enzyme (*) ou HCNa
F2 A Foie de rat	phénol (105)	7,3 p.100	12 p.100	1,65	0,86 p.100	7 500	49 p.100
F2 B " "	"	7,35 p.100	13,3 p.100	1,8	0,55 p.100	7 850	27,6 p.100
F6 Foie de boeuf	"	96 µg/ml	165 µg/ml	1,72	0,96 µg/ml	7 460	21 p.100 (*)
F7 " "		208 µg/ml	375 µg/ml	1,8	0,66 µg/ml	8 000	20,6 p.100
INRA Foie de veau	"	150 µg/ml	255 µg/ml	1,70	0,90 µg/ml	7 330	24 p.100
NBC Levure	-	9,25 p.100	16,3 p.100	1,76	0,6 p.100	7 460	20 p.100
MERCK "	-	9,45 p.100	16,64 p.100	1,76	0,5 p. 100	7 500	22 p. 100

- TABLEAU IV -

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DES ADN UTILISES

NATURE ET ORIGINE de l'ADN	MODE d'EXTRACTION	P p.100	N p.100	N/P	PROTEINES	ε(P)	HYPERCHROMICITE C1H
V 27 Thymus de veau	phénol (73)	9,15			1,7	6 400	32,4 p.100
V3(5) Thymus de veau	dodécyl (93)	7,8	14	1,78	0,99	6 850	36,6 p.100
V 5 "	" "	8,4	14,9	1,78	2,6	6 650	31,4 p.100
V 61 "	" "	8,6	14,3	1,67	# 0	6 750	35,6 p.100
V 69 "	papaïne (132)	8,37	14,95	1,78	0,18	6 850	40 p.100
V 74 "	dodécyl (93)	8,75	14	1,61	0,21	7 100	43,3 p.100
V 76 "	papaïne (132)	8,5	14,85	1,74	1,41	6 750	39,6 p.100
V 77 "	dodécyl (93)	8,45	13,8	1,64	0,59	6 700	40,5 p.100
V 80 "	" "	8,68	14,9	1,72	0,35	6 700	40,5 p.100
V 82 "	" "	8,6	13,75	1,60	1,26	6 900	35,8 p.100
V 84 "	papaïne (132)	9,0	15,2	1,69	1,52	6 560	34,0 p.100
V 89 "	" "	9,0	14,6	1,62	3,3	6 950	33,0 p.100
V 90 "	dodécyl (93)	9,0	15,25	1,69	# 0	6 780	36,2 p.100
V 92 "	papaïne(132)	8,5	14,55	1,70	# 0	6 790	41,0 p.100
V 97 "	" "	8,8	15,37	1,75	# 0	6 940	37,0 p.100
MAQ III sperme de maquereau	" "				1,4	6 550	33,0 p.100
S 42 Organes de souris	dodécyl (93)	7,47	13,5	1,81	2,37	6 786	38,2 p.100

Le dosage de l'azote et du phosphore nucléiques constitue des critères de pureté, que l'on considère les résultats isolément ou sous forme de rapport azote/phosphore. Les valeurs consignées dans les tableaux III et IV varient légèrement d'un AN à l'autre : pour l'ARN les variations sont les suivantes : N de 12 à 16,6 p. 100, P de 7,3 à 9,45 p. 100, N/P de 1,65 à 1,80, tandis que les constantes normalement définies pour l'ARN sont : N 15 - 16 p. 100, et P 8,5 à 9 p. 100 (116). Pour l'ADN le pourcentage d'azote est compris entre 13,5 et 15,3, le taux de phosphore varie de 7,5 à 9 p. 100 et le rapport N/P va de 1,60 à 1,80 ; les valeurs trouvées dans la littérature étant pour l'ADN P 19 p. 100 et N 15 p. 100 (93).

La séquence des nucléotides peut modifier le rapport azote/phosphore : c'est ainsi que la prépondérance des bases puriques sur les bases pyrimidiques et celle de la cytosine sur l'uracile se traduit par une augmentation azote/phosphore.

Les valeurs anormales révèlent la contamination de la préparation par d'autres substances azotées, généralement les protéines dont le dosage peut être effectué par des méthodes spécifiques, comme la technique au biuret (63), et la technique de LOWRY (112, 147). Cette dernière technique est basée sur la détermination colorimétrique du complexe obtenu après réduction par les protéines en présence d'ions cuivriques, du réactif phospho-tungsto-molybdique de FOLIN et CIOCALTEU. La sensibilité de cette technique est 100 fois plus grande que celle de la réaction au biuret ; il faut cependant savoir que de nombreuses substances étrangères interfèrent avec les protéines notamment l'acide urique, la guanine, la xanthine et de nombreux phénols ; point particulièrement important pour les AN préparés par une technique au phénol.

II- ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES -

L'absorption de la lumière intraviolette par les AN en solution à des longueurs d'onde comprises entre 230 et 290 millimicrons revêt un grand intérêt car elle est le témoin de la pureté et du degré de polymérisation des AN.

Cette propriété des AN d'absorber l'U.V. n'est, en effet, pas spécifique de ces polynucléotides : elle se retrouve pour toutes les substances qui contiennent les bases puriques et pyrimidiques mais aussi pour d'autres substances

contaminantes comme les protéines et le phénol. Le maximum d'absorption des AN se situe à 260 millimicrons tandis que celui des protéines et du phénol se situe à 230 et 280 millimicrons. Les rapports de la densité optique à 260 millimicrons à la densité optique pour ces longueurs d'onde constituent donc le critère du côté des AN : un échantillon d'AN impur aura, en effet, des rapports de densités optiques perturbés.

L'analyse spectrophotométrique des AN permet également de contrôler, par les calculs du coefficient d'extinction molaire et par la mesure de l'effet hyperchromique, l'altération éventuelle des AN au cours de leur préparation.

1°- Calcul du coëfficient d'extinction molaire.

Le coefficient d'extinction molaire .(P) est égal à la densité optique à 260 millimicrons d'une solution contenant un atome gramme de phosphore nucléique par litre. Il n'est, en effet, pas possible de rapporter la densité optique au poids sec de l'AN ou à son poids moléculaire vrai. Dans le premier cas, il serait difficile de faire le partage entre l'eau absorbée et l'eau de constitution nécessaire à la stabilité de l'édifice moléculaire nucléique ; dans le second cas, on ne connaîtrait pas avec précision suffisante le poids moléculaire d'un AN, qui ne peut d'ailleurs être exprimé que par une valeur moyenne étant donné l'hétérogénéité considérable de la taille des molécules dans un échantillon d'AN provenant d'un organisme supérieur.

Il convient de noter que le coëfficient d'extinction d'un AN s'accroît de façon significative lors de la dégradation de l'hydrolyse, car la somme des extinctions des nucléotides est supérieure à l'extinction du polynucléotide lui-même (effet hyperchromique).

Les valeurs de ce coefficient d'extinction molaire varient d'un AN à l'autre (Tableaux III et IV, pages 32 et 33) ; ils sont généralement de 7 200 pour l'ARN et 6 650 pour l'ADN.

2°- Mesure de l'effet hyperchromique.

L'effet hyperchromique, dû à la rupture des liaisons hydrogène qui apparie normalement les bases modifiant de ce fait les propriétés optiques de ces composés puriques et pyrimidiques, se manifeste aussi bien pour l'ADN où l'appariement intéresse deux chaînes complémentaires, que pour l'ARN, l'appariement étant cette fois intramoléculaire par repliement d'une seule chaîne sur elle-même.

La mesure de cet effet hyperchromique peut se faire, en principe, seulement après hydrolyse totale des AN par les nucléases, la soude (pour l'ARN) ou l'acide chlorhydrique. L'augmentation de la D.O. maximale à 260 millimicrons traduit l'effet hyperchromique ; cette augmentation est généralement exprimée en pourcentage de la D.O. maximale avant dégradation de l'AN, et se situe pour un ADN entre 35 et 45 p. 100. Pour les ARN précipités par l'alcool, les augmentations de D.O. sont de l'ordre de 25 p. 100 ; pour ceux précipités par une solution de ClNa 3 M, elles sont de l'ordre de 45 à 50 p. 100.

Les tableaux III et IV indiquent les valeurs trouvées dans notre laboratoire.

L'existence d'une absorption anormalement élevée en lumière ultra-violette (rapportée à la concentration moléculaire en phosphore de l'AN) signe toujours l'altération d'un AN. Malheureusement, il peut arriver qu'un AN dénaturé absorbe normalement la lumière ultra-violette ; dans ce cas, des ponts hydrogène, artificiellement formés pendant la manipulation des AN, remplacent les liaisons hydrogène natives et engendrent l'effet hyperchromique.

Il serait donc injustifié sur le plan analytique de conclure à la bonne qualité d'un AN par la seule mesure de l'effet hyperchromique. Un effet hyperchromique normal est cependant la première condition à remplir pour garantir le degré de haute polymérisation d'un AN.

III- ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE ET ELECTROPHORETIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES -

La chromatographie et l'électrophorèse ont reçu des applications fructueuses dans l'analyse des AN ; elles permettent, en effet, soit de les séparer en différentes fractions encore hautement polymérisées, soit au contraire, d'isoler et de doser les bases de l'ADN par chromatographie sur papier ou les nucléotides de l'ARN par électrophorèse, après hydrolyse chimique ou enzymatique de ces AN.

De telles analyses n'ont pas été effectuées dans le cadre de ce travail, mais ces techniques sont mentionnées dans une revue générale récente (131).

o

o o

DEUXIEME PARTIE

DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

* * * * * * *

GENERALITES SUR LES METHODES DE DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

Des méthodes très diverses permettent le dosage des AN : elles sont le plus généralement d'ordre physique ou chimique, il est toutefois intéressant de noter que des techniques bactériologiques ont été proposées (123). En fait, le dosage des AN se limite à l'estimation quantitative de l'un de leurs trois groupes de constituants : le phosphore, le pentose ou les bases.

Il est primordial que lors de l'extraction des AN, on puisse récupérer complètement ces constituants nucléiques au détriment des structures moléculaires qui seront inévitablement altérées ; de plus, il faut assurer l'élimination des substances susceptibles d'être des causes d'erreur notamment les protéines, les polysaccharides et les composés phosphorés (DPN, FAD, ATP, phosphates inorganiques et organiques, nucléotides, phospholipides, etc...).

Il est évident que les techniques de dosage du phosphore seront applicables aux deux AN. Seules les techniques de dosage concernant l'un des composants spécifiques de chaque AN, c'est-à-dire les sucres et certaines bases (la thymine pour l'ADN et l'uracile pour l'ARN), permettront donc l'estimation quantitative d'un AN en présence de l'autre.

Aussi, dans le but d'orienter notre travail, nous décrirons, d'une part, les méthodes de dosage communes aux deux AN parce qu'elles concernent un constituant commun, et, d'autre part, les méthodes permettant un dosage spécifique de chacun des AN.

- CHAPITRE I -

METHODES DE DOSAGE COMMUNES A L'ARN ET A L'ADN

Ces méthodes concernent le dosage spectrophotométrique des AN et le dosage colorimétrique des bases puriques, de la cytosine et du phosphore.

1°- Dosage colorimétrique du phosphore nucléique -

Toutes les techniques classiques de dosage du phosphore, après minéralisation, reposent sur le dosage colorimétrique des phosphates dont la transformation complète en un phosphomolybdate est suivie d'une réduction en un complexe molybdique bleu.

Les réducteurs utilisés sont des plus divers : FISKE et SUBBA ROW (61) proposent l'emploi de l'acide 1-amino-2-naphtolsulfonique, BELL-DOISY et BRIGGS (21) utilisent l'hydroquinone en milieu sulfite et acide, tandis que de nombreux auteurs font appel au chlorure stanneux (13, 15, 148). Nous avons retenu, en raison surtout de la sensibilité de la coloration, la technique de DRYER, TAMMES et ROUTH (51) modifiée par TRUHAUT, BOHUON et LE TALAER (166) et basée sur la réduction du phosphomolybdate par la N-phényl-para-phénylène diamine (para-sémidine).

a) Réactifs -

R.1 - Acide sulfurique 5 N (par dilution de l'acide sulfurique concentré R.P.)

R.2 - Perhydrol Merck

R.3 - Solution de sulfite de sodium à 4 g pour 100 ml d'eau distillée

R.4 - Solution de molybdate d'ammonium neutre
$(NH_4)_6 Mo_7 O_{24}, 4 H_2O$ R.P. 0,025 M

Molybdate d'ammonium neutre pulvérisé . . 3,09 g
Eau bidistillée q.s.p. . . . . 100 ml

(Conserver ce réactif à l'abri de la lumière).

R.5 - Solution de chlorhydrate de para-sémidine à 0,05 p. cent dans du bisulfite de sodium à 1 p. cent :

Introduire 50 mg de para-sémidine dans une fiole jaugée de 100 ml, humidifier avec quelques gouttes d'alcool à 95°, compléter à 100 ml avec une solution de bisulfite de sodium à 1 p.cent tout en agitant ;

laisser 15 minutes en contact, et filtrer pour éliminer le résidu insoluble.

Ce réactif se conserve bien à + 4° dans un flacon coloré ; cependant au bout d'un mois environ, une légère coloration bleue apparaît Cette coloration n'altère pas la valeur du réactif, elle augmente simplement l'absorption du témoin.

R.6 - Solution mère étalon de phosphore à 1 mg de phosphore par ml.

Phosphate monopotassique R.P.	438,1 mg
Eau bidistillée q. s. p.	100 ml

(Conserver ce réactif à l'abri de la lumière)

R.7 - Solution fille étalon de phosphore à 10 microgrammes de phosphore par ml, obtenue par dilution au 1/100 de la solution mère dans de l'eau bidistillée.

b) Mode opératoire -

Minéralisation.

Une prise d'essai d'AN ou de produits d'hydrolyse contenant de 10 à 100 microgrammes de phosphore est minéralisée pendant 5 heures dans des fioles de Kjeldahl de 30 ml avec 2 ml d'acide sulfurique 5 N (R.1) et quelques grains de carborandum. Dès l'apparition de vapeurs blanches, on ajoute, après léger refroidissement, 0,2 ml de perhydrol (l'eau oxygénée en excès développe une coloration jaune avec le molybdate). Attendre la décomposition du perhydrol avant d'arrêter le chauffage, puis ajouter 2 ml d'eau bidistillée. L'ébullition est maintenue durant 30 minutes environ pour hydrolyser les polyphosphates. Transvaser le minéralisat dans un tube jaugé de 10 ml, en rinçant plusieurs fois le Kjeldahl avec 2 ml d'eau bidistillée et compléter à 10 ml.

Coloration.

Dans un tube à essai, on ajoute successivement dans l'ordre :

Minéralisat dilué	5 ml
Solution de sulfite de sodium (R.3)	1 ml
Solution de molybdate d'ammonium neutre (R.4)	1 ml
Solution de parasémidine (R.5)	2 ml
Eau bidistillée q. s. p.	10 ml

On agite après addition de chaque réactif. Au bout d'une heure on lit l'absorption au spectrophotomètre à 770 millimicrons contre un témoin de minéralisation obtenu dans les mêmes conditions mais sans addition de composés nucléiques.

c) Obtention de la courbe étalon.

A partir de la solution de phosphore R.7, on fait une gamme s'étendant de 0 à 50 microgrammes.

Pour se trouver au même pH, on opère de la façon suivante :

Solution étalon fille de phosphore (R.7) . . .	X ml
Acide sulfurique 5 N (R.1)	1 ml
Solution de sulfate de sodium (R.3)	1 ml
Solution de molybdate neutre (R.4)	1 ml
Solution de parasémidine (R.5)	2 ml
Eau bidistillée q. s. p.	10 ml

On lit au spectrophotomètre à 770 millimicrons contre un témoin réactif obtenu dans les mêmes conditions, la solution étalon étant remplacée par de l'eau bidistillée. On trace la courbe donnant la quantité de phosphore en fonction de la densité optique.

A 10 microgrammes de phosphore correspond au bout d'une heure une densité optique de 0,125.

d) Expression des résultats :

Le report à la courbe étalon permet de déterminer d'après la D.O. lue à 770 millimicrons, la teneur en phosphore de 5 ml de minéralisat. Il convient donc de multiplier par deux cette valeur pour connaître la teneur en phosphore de la prise d'essai d'AN.

Les résultats sont alors exprimés, soit par rapport au volume de la solution d'AN, soit par rapport au poids sec de cet AN ; dans un cas, la concentration sera exprimée en microgrammesde phosphore par millilitre, et dans l'autre, on calculera le pourcentage de phosphore contenu dans l'échantillon analysé.

e) Spécificité de la méthode :

Une telle expression des résultats sous-entend que tout le phosphore dosé est d'origine nucléique. Ceci n'est pas toujours le cas; lorsque ce dosage est effectué sur des AN extraits par la technique de SCHMIDT-THANNHAUSER, la répartition différentielle des AN s'effectue, en effet, au détriment de la fraction ribonucléique qui renferme à côté des phosphates inorganiques d'autres composés phosphorés non nucléiques (126) dont la présence rend illusoire le dosage de l'ARN par le seul dosage du phosphore (on note des erreurs par excès pouvant atteindre 25 p. cent). Tout dosage du phosphore ribonucléique demande donc, dans ce cas, à être contrôlé, soit par l'absorption en ultraviolet, soit par le dosage du ribose; nous rejetterons donc a priori, l'utilisation d'une telle technique pour le dosage de l'ARN dans l'ADN.

Remarque :

Le dosage du phosphore permet, en outre, l'estimation des AN totaux de nombreux tissus animaux. L'extraction complète des lipides et des composés phosphorés acidosolubles élimine, en effet, les principales causes d'erreur qui ne subsistent que par la présence de phosphoprotéines dont le taux comparé à celui des AN est négligeable dans la plupart des tissus (sauf les oeufs, la glande mammaire et le tissu nerveux). Aussi, le dosage du phosphore après extraction des lipides et des acidosolubles constitue-t-il une bonne approximation de la concentration en phosphore nucléique de nombreux tissus.

2°- Dosage spectrophotométrique des acides nucléiques -

Les AN en solution absorbent fortement la lumière ultraviolette à des longueurs d'onde comprises entre 230 et 290 millimicrons. Ce n'est pas une propriété spécifique des polynucléotides car cette absorption est due au système de doubles liaisons conjuguées des cycles puriques et pyrimidiques et se retrouve pour toutes les substances qui contiennent ces bases et, notamment, les nucléosides, les nucléotides, et les AN, sans qu'il soit possible de constater une différence significative dans l'absorption de l'ARN et de l'ADN.

Les courbes d'absorption dans l'ultraviolet de l'ARN et de l'ADN sont pratiquement identiques (figure 7, page 43) et ne permettent pas de diffé-

rencier un des AN en présence de l'autre. Dans un milieu de force ionique et de pH déterminé, généralement ClNa 0,15 M ou tampon phosphate 0,01 M pH 7,0, le maximum d'absorption se situe à 258-259 millimicrons. Il existe un premier maximum avant 220 millimicrons et un minimum à 230 millimicrons. En fait, les spectrophotomètres courants ne permettent pas d'effectuer de bonnes mesures en deçà de 220 millimicrons ; au delà de 260 millimicrons, la densité optique (D.O.) diminue rapidement pour devenir pratiquement nulle à partir de 300 millimicrons.

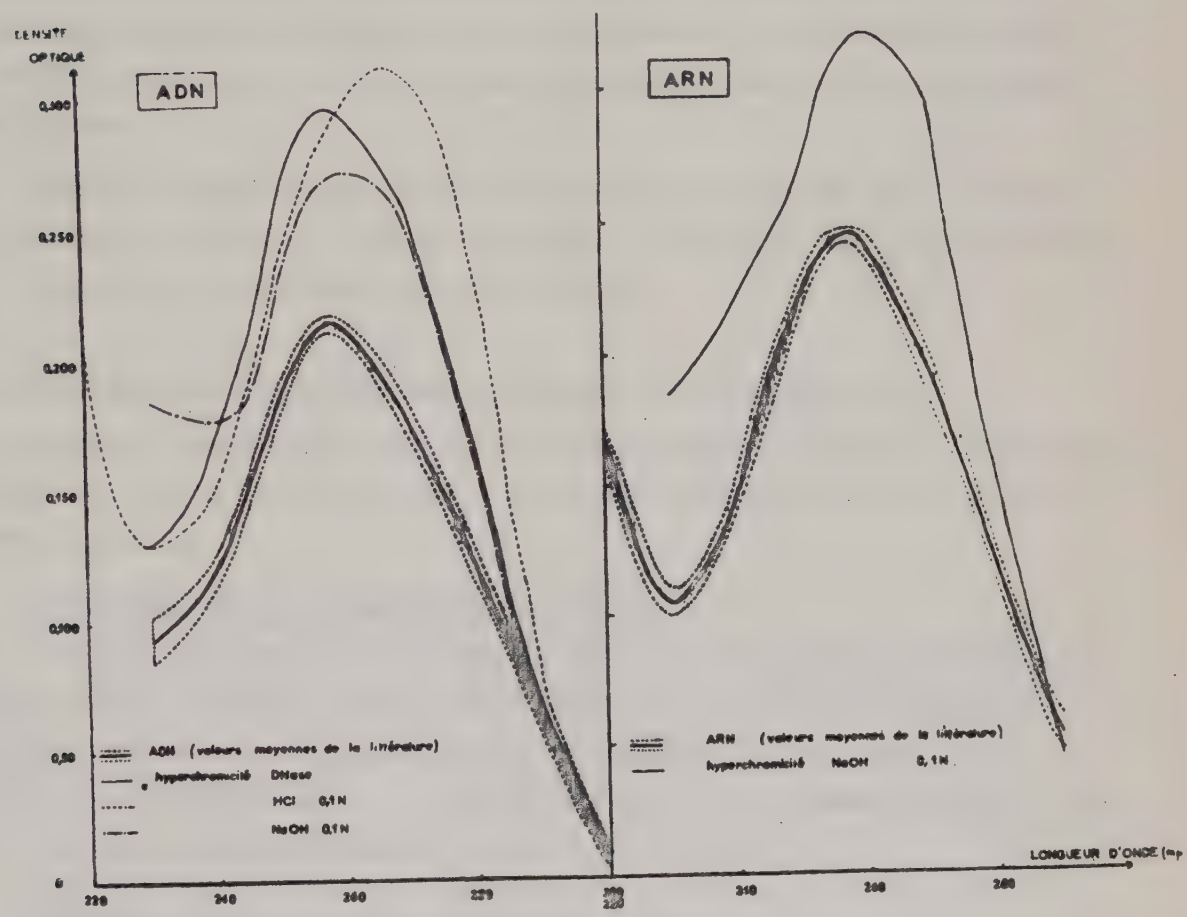


Figure 7

Spectre des acides nucléiques en lumière ultra-violette.

concentrations étudiées : 1 microgramme par ml de phosphore nucléique.

- Dosage des AN d'après leur absorption à 260 millimicrons -

Le dosage spectrophotométrique des AN est, a priori, séduisant par sa simplicité : il suffit, en effet, de diviser la D.O. lue à 260 millimicrons par la D.O. correspondant à 1 microgramme de phosphore ribonucléique ou désoxyribonucléique soit dans le premier cas 0,240 et dans le second 0,212 pour connaître, compte tenu de la dilution, la concentration en phosphore nucléique de la solution. Mais ces résultats peuvent être erronés par la présence de substances interférentes diverses tels les acides aminés aromatiques, les protéines qui en contiennent, l'acide trichloracétique, etc... et par la dégradation de l'AN toujours possible au cours de l'extraction ou au contact du solvant ; toute dégradation de l'AN entraîne une augmentation de l'absorption (effet hyperchromique) qui se traduit par des résultats en excès et un déplacement des spectres.

Ainsi, ce dosage reste délicat et nécessite un contrôle par le dosage du phosphore ou du pentose. Cette technique peut, cependant, être utilisée pour le dosage des AN totaux dans les tissus (162).

3°- Dosage colorimétrique des bases communes à l'ARN et à l'ADN -

Les bases communes aux deux AN, adénine, guanine et cytosine, font chacune l'objet d'un dosage colorimétrique ; ces dosages, laborieux, sont, en fait, rarement utilisés.

a) Détermination colorimétrique de l'adénine.

Après réduction par la poudre de zinc, en milieu acide, l'adénine par diazotation et copulation avec le chlorhydrate de N 1-naphtyléthylène diamine, donne une coloration rouge spécifique ; ce complexe coloré permet, selon la technique de WOODHOUSE (177), le dosage de 5 à 40 microgrammes d'adénine dans les hydrolysats de nucléotides ou d'acides nucléiques.

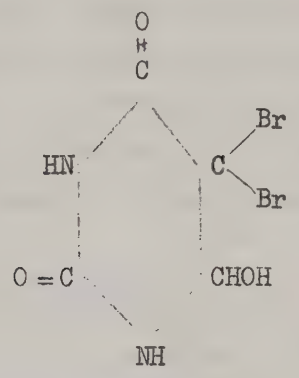
b) Détermination colorimétrique de la guanine.

La coloration bleue que développent la guanine et la xanthine au contact du réactif de Folin au phénol permet de déterminer de 0,7 à 2,8 micromoles de chacune de ces bases. Mais cette technique, mise au point par HITCHINGS (84), reste limitée dans ses applications car le réactif utilisé manque de spé-

cificité : l'adénine et l'hypoxanthine n'ont aucun pouvoir chromogénique mais il est nécessaire d'extraire les purines des broyats cellulaires en les précipitant par le bisulfite de cuivre pour les séparer des autres chromogènes tels que la cystéine, le glutathion forme réduite et l'acide urique.

c) Détermination colorimétrique de la cytosine -

Le dosage colorimétrique de la cytosine, pratiqué par SOODAK, PIRCIO et CERECEDO (154), n'est qu'une extension de la réaction colorée de WHEELER et JOHNSON (174) : dans les deux cas, la pyrimidine traitée par l'eau de brome donne lieu à la formation du 5 dibromo-4-hydroxyhydro-uracile (voir figure ci-dessous) qui peut être, soit traité par l'hydroxyde de baryum, soit additionné d'arsénotungstate de lithium ; dans le premier cas, il se forme des sels de baryum pourpres (réaction de WHEELER-JOHNSON), tandis que, dans le second cas, la réduction de l'arsénotungstate de lithium permet un dosage quantitatif de la pyrimidine (technique de SOODAK et Coll.).



Ce dosage étant basé sur la réduction du sel de lithium par la cytosine bromée, des corps tels que la cystéine, le glutathion forme réduite et l'acide urique ne peuvent plus interférer après ce traitement par l'eau de brome.

Seul l'uracile dont le composé bromé est le dibromohydroxyhydro-uracile, sera dosé dans les mêmes conditions que la cytosine. Cependant l'absorption de la cytosine sur résine échangeuse d'ions (Amberlite ou Decalso) permet le dosage séparé de ces deux pyrimidines (154) (quantité dosable : 6 à 33 microgrammes de cytosine ou d'uracile).

- CHAPITRE II -

TECHNIQUES PERMETTANT LE DOSAGE SPECIFIQUE DE L'ARN

Comme nous l'avons vu, lors de l'étude sur la structure des AN, ces deux acides diffèrent par leur sucre : désoxyribose d'une part, et ribose de l'autre ; et par une de leurs bases pyrimidiques, thymine pour l'ADN, uracile pour l'ARN. Les techniques de dosage de ces divers composants, responsables des différences chimiques entre ces deux polynucléotides revêtent donc, de ce fait, un caractère spécifique.

1°- Dosage colorimétrique de l'uracile -

L'uracile et la cytosine donnant, après traitement par l'eau de brome, le même composé bromé, 5 dibromo-4-hydroxyhydro-uracile, la technique de SOODAK et Coll. (154) proposée pour le dosage de la cytosine s'applique, dans les mêmes conditions, au dosage de l'uracile (voir chapitre précédent). Il est nécessaire, dans ce cas, de retenir la cytosine sur résines échangeuses d'ions.

2°- Dosages colorimétriques du ribose -

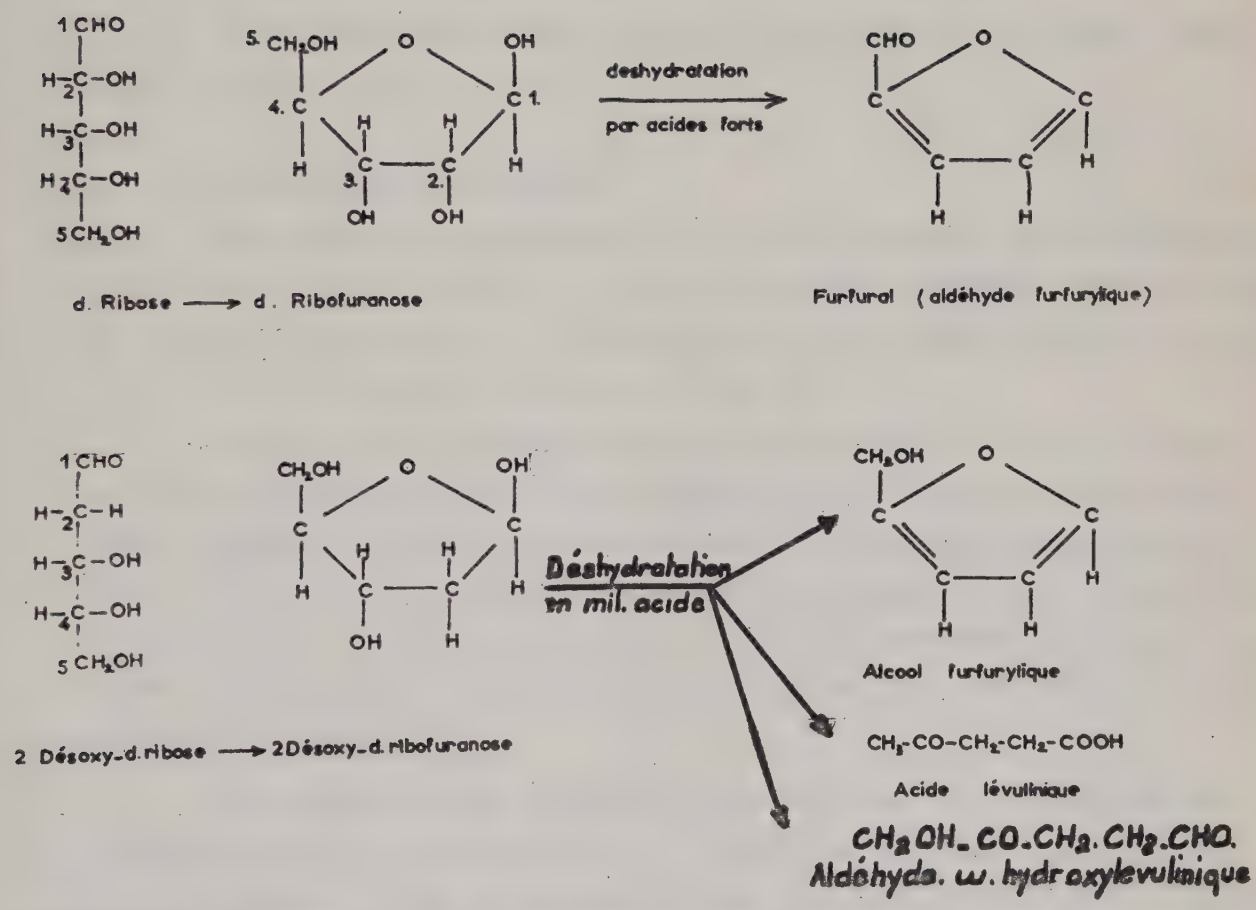
En milieu acide concentré, le ribose se déshydrate en formant le furfural (aldéhyde furfurylique - figure 8 page 47) qui, combiné à certains dérivés aromatiques, donne des composés colorés permettant le dosage spectrophotométrique du ribose et des ARN.

Le furfural peut être combiné aux composés aromatiques, soit de façon indirecte après extraction, soit directement en cours de formation.

a) Dosage indirect du furfural.

L'aldéhyde furfurylique, produit de déshydratation du ribose en présence d'un acide concentré, peut être extrait du milieu de formation par distillation ou par le xylène et mis à réagir ultérieurement avec des composés aromatiques. DAVIDSON et WAYMOUTH (38) font réagir l'extrait furfural-xylène

avec l'acétate d'aniline pour former une coloration rouge. Bien que l'ADN n'interfère pas, cette méthode reste d'un emploi difficile car elle nécessite l'élimination complète de l'acide chlorhydrique avant de pouvoir développer la coloration qui s'avère d'autre part instable à la lumière.



DEGRADATION DU RIBOSE ET DU DESOXYRIBOSE PAR LES ACIDES FORTS

Figure 8

Le principe même de l'extraction présente cependant l'avantage de concentrer le furfural formé et d'éliminer ou de réduire au minimum les substances dont l'interférence n'est pas due à la formation de furfural. Pour conserver ces avantages, WEBB (171) fait réagir le chlorhydrate de p-bromophénylhydrazine (en solution dans un mélange alcool éthylique - acide chlorhydrique) avec le furfural extrait par le xylène. La coloration obtenue est stable et reproductible ; elle permet le dosage de 10 à 150 microgrammes d'ARN ; seul le ribose des nucléotides puriques entre dans ce cas, en réaction avec la p-bromophénylhydrazine. L'ADN n'interfère pratiquement pas dans la réaction puisque un milligramme de ce polynucléotide donne une coloration négligeable probablement due à la présence d'ARN dans l'ADN.

Cette technique est séduisante mais laborieuse puisque chaque détermination dure au moins 4 heures.

b) Dosage direct du furfural.

Les extractions précédentes sont toujours longues , aussi préfère-t-on généralement combiner le furfural, dès sa formation, à l'orcinol, à la cystéine ou au phloroglucinol. Ces différentes méthodes de dosage direct du furfural ont été rassemblées dans le tableau V (page 49).

Ces réactions colorées ne sont pas spécifiques du ribose : ce sont, en fait, des réactions plus ou moins générales des pentoses et de certains autres hydrates de carbone : quelle que soit la substance chromogénique utilisée, on constate l'interférence plus ou moins marquée de corps susceptibles d'être extraits des tissus en même temps que l'ARN, notamment le désoxyribose, l'ADN, les méthylpentoses, les acides hexuroniques, les aldo- et céto-hexoses et les aldo-heptoses (45).

Pour augmenter leur spécificité, ces réactions sont entreprises dans des conditions précises d'acidité et de température qui sont optimales pour la conversion du ribose en furfural tout en diminuant la possibilité d'interférence des autres sucres.

1- Réactions au phloroglucinol.

L'instabilité de la coloration et l'interférence de nombreux sucres ne permettent pas d'utiliser la réaction au phloroglucinol de Tollens sous sa forme originale pour la détermination quantitative du ribose et de l'ARN.

- TABLEAU V -

PRINCIPALES METHODES COLORIMETRIQUES DE DOSAGE DIRECT DU FURFURAL PROVENANT DE L'HYDROLYSE ACIDE DU RIBOSE ET DE L'ARN

Réactifs utilisés	ORCINOL			PHLOROGLUCINOL		CYSTEINE
Références	BIAL (14)	MOULE(126)	MASSART et HOSTE (119)	von EULER et HAHN(58)	BOLOGNANI et Coll.(17)	DISCHE (46)
Conditions de mise en oeuvre	Orcinol + ClH +Cl3Fe 100° 3 min.	+ Cl2Cu 100° 20 min.	-Brome (105° C 5 min.) -Elimination du brome -Chauffage 105° C 38 min. - et orcinol +Cl2Cu, ClH (105° 10 min)	CH_3COOH + Cl3Fe 100°C 50 min. + Phloroglucinol 20-30°, 20 min. et 100° 4 min.	+ CH_3COOH ClH Glucose Phloroglucinol 100° C 15 min.	Cystéine SO_4H_2 Conc. 20°-30° C 15 min.
sucre dosé	Ribose lié aux bases puriques		Ribose total	Ribose lié aux bases puriques		
Sensibilité (microg. ARN)	10		50 microg.de nucléosides puriques et pyrimidiques	100	20	20
Interférence avec	Protéines Hexoses ADN(env. 10 p.100)			nombreux sucres	Ac. glycuronique ADN Sucres cétoniques	Aldohexoses ADN 1,5 p.100
Avantages	Simple		Dosage du ribose total	Aucune interférence des protéines ou de l'ADN		Faible interférence de l'ADN ; aucune interférence des protéines
Inconvénients	Interférence avec ADN et glucose (dans ce cas, lecture dichromatique)		Laborieuse	Peu sensible Laborieuse Mauvaise spécificité	Interférences avec l'ADN et les sucres cétoniques	Coloration peu stable

La modification apportée à cette réaction par HAHN et von EULER (82), bien qu'elle soit recommandée par ses auteurs pour le dosage de l'ARN en présence d'ADN, ne peut être retenue du fait de son manque de sensibilité ; elle demeure, cependant, la seule technique de dosage direct du furfural où l'interférence du désoxyribose et de l'ADN est nulle, car, semble-t-il, le chauffage prolongé à 100° C détruit le désoxyribose ou ses dérivés susceptibles de former des composés colorés avec le phloroglucinol (46).

La technique de DISCHE-BORENFREUND se révèle beaucoup plus sensible que la précédente, mais il convient d'éliminer par lecture dichromatique l'interférence de certains autres sucres et notamment celle du désoxyribose. L'analyse spectrale des colorations fournies par l'ARN et par l'ADN met en évidence pour ces deux polynucléotides un maximum d'absorption à 552 millimicrons ; l'ADN présente, en outre, un second pic à 460 millimicrons (figure 9 courbe inférieure, page 51). D'autre part, dans le cas de l'ADN, les densités optiques lues à 552 et à 510 millimicrons étant très voisines, il y a lieu de procéder à cette lecture différentielle pour éliminer l'interférence de l'ADN. Parallèlement, l'absorption à 552 millimicrons est pour l'ARN 4 fois plus forte qu'à 510 millimicrons ; la différence importante qui en résulte conserve à ce dosage sa spécificité et lui confère une bonne sensibilité.

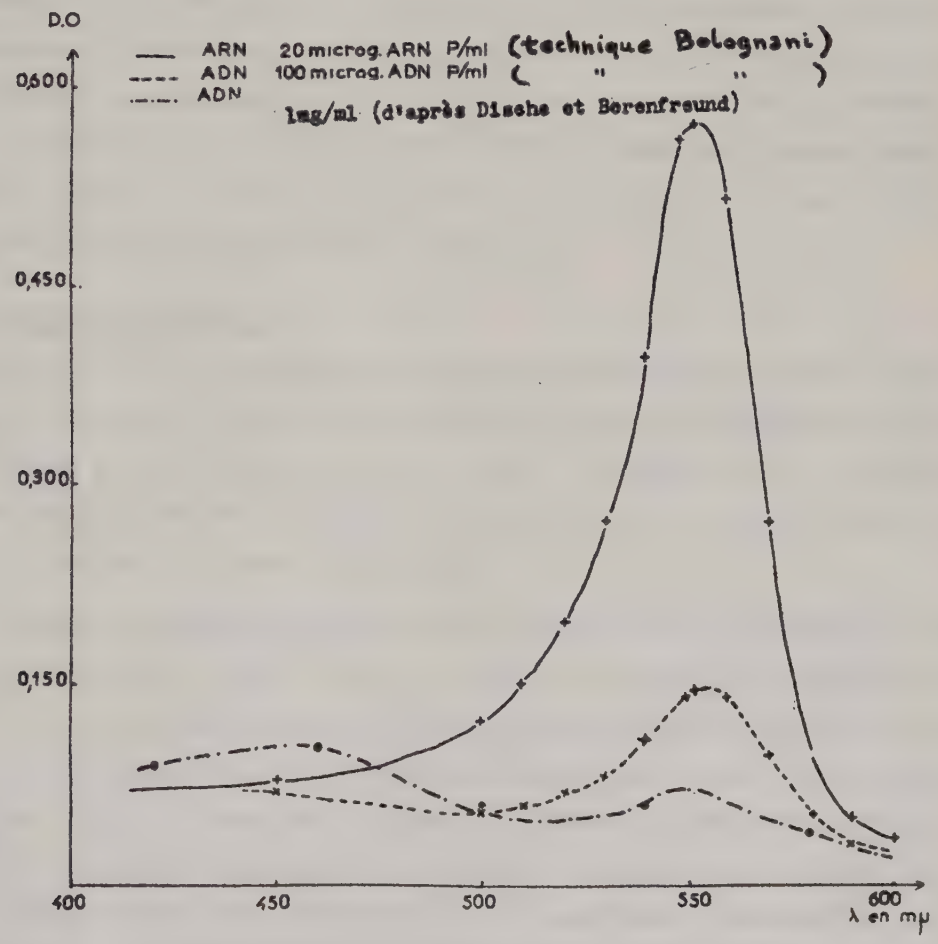
En augmentant la concentration du milieu réactionnel en acide chlorhydrique, BOLOGNANI et coll. (17) ont doublé approximativement la sensibilité de cette réaction mais au détriment de sa spécificité. En effet, dans ces conditions, l'interférence de l'ADN n'est plus éliminée par lecture dichromatique : l'analyse spectrale des colorations fournies par l'ADN et par l'ARN permet de construire deux courbes d'allure pratiquement identique qui témoignent de l'inefficacité d'une lecture différentielle (figure 9, page 51).

2- Réactions à la cystéine.

Cette réaction de DISCHE (46), qui s'effectue en présence d'acide sulfurique concentré, est fournie par tous les hydrates de carbone susceptibles de former, dans ces conditions, du furfural ou des homologues correspondants ; ces dérivés furfuraliques, que caractérise leur intense absorption de la lumière ultra-violette, forment avec la cystéine de nouveaux composés qui absorbent dans le bleu : les maxima d'absorption des composés furfuraliques

généralement situés entre 305 et 330 millimicrons, se retrouvent ainsi situés, après combinaison à la cystéine, entre 390 et 415 millimicrons.

La coloration développée par le ribose ou l'ARN est maximale 15 minutes après l'addition de cystéine, puis elle décroît lentement pour devenir nulle au bout de 24 heures. Cette instabilité de la coloration nécessite la lecture simultanée des D.O. de la solution à doser et de la solution étalon ; elle interdit tout report à une courbe étalon. Pour ces différentes raisons, bien que l'interférence de l'ADN y soit faible (1,5 p. cent), cette réaction est peu recommandable pour le dosage de l'ARN.



ETUDES SPECTRALES DES REACTIONS COLORÉES DES ACIDES NUCLEIQUES AVEC LE PHLOROGLUCINOL

Figure 9

Les réactions des AN avec la cystéine et l'acide sulfurique modifiées par BAKAY, KIRSHNER et TOENNIES (8), ont permis à ces auteurs de doser l'ARN et l'ADN dans certains tissus. L'extraction des AN à 100° C par l'acide trichloracétique (TCA) à 10 p. cent nécessite d'effectuer deux extractions séparées, l'une de 8 minutes pour l'ADN, l'autre de 40 minutes pour l'ARN.

L'ADN, maintenu 20 minutes au bain-marie à 60°C en présence de cystéine et d'acide sulfurique concentré, fournit une coloration dont le maximum se situe à 470 millimicrons, tandis qu'après addition de cystéine, la coloration fournie par l'ARN préalablement chauffé 20 minutes au bain-marie à 100°C en présence d'acide sulfurique seul, présente un maximum d'absorption à 390 millimicrons.

Cependant, bien que lors de l'hydrolyse de l'ARN, la réactivité de l'ADN soit fortement diminuée par l'action prolongée de l'ATC, l'ADN interfère dans la détermination colorimétrique de l'ARN lorsque les quantités présentes sont dix fois supérieures à celles de l'ARN. Cette technique utilisable lors de l'estimation rapide de l'ARN et de l'ADN dans les tissus ne permet donc pas le dosage de faibles quantités d'ARN dans l'ADN.

3- Réactions à l'orcinol.

Chauffé à 100°C, en présence d'acide chlorhydrique concentré, l'ARN est hydrolysé et le ribose, converti en furfural, réagit immédiatement avec l'orcinol pour donner une intense coloration verte ; la simplicité et la grande sensibilité de cette réaction de BIAL (14) en font la base d'une méthode de choix pour le microdosage du ribose et de l'ARN.

La première adaptation quantitative de cette réaction colorée fut faite, en 1937 par DISCHE et SCHWARTZ (44), et devait peu après, être modifiée par MEJBAUM (120) : les modifications portèrent essentiellement sur le temps de chauffage qui fut porté de 3 à 20 minutes, tandis que la solution à doser était traitée par un volume égal de réactif appauvri en chlorure ferrique et en orcinol. Ce procédé permet de meilleures évaluations quantitatives mais la technique de DISCHE et SCHWARTZ (44) constitue, cependant, le meilleur test qualitatif.

La technique de MEJBAUM peut être utilisée sous sa forme initiale ou suivant les indications d'ALBAUM et UMBREIT (1) qui maintiennent 45 minutes le chauffage à 100° C pour obtenir une coloration maximale. Ce chauffage prolongé préconisé par de nombreux auteurs (29,86,89,119,139,140), s'il augmente la sensibilité de la réaction, accroît parallèlement l'interférence des autres sucres, en particulier celle du glucose (46). Il est donc souhaitable de stopper par un brusque refroidissement la réaction au bout de 20 minutes, sa sensibilité restant, par ailleurs, largement suffisante.

En 1942, BARRENSCHEEN et PEHAM (11) rapportèrent que la réaction de BIAL pouvait être améliorée en substituant le chlorure cuivrique au catalyseur habituel, le chlorure ferrique. Parmi les techniques ainsi modifiées (29, 119), nous avons retenu, pour la réalisation de nos travaux, la technique de MOULE (126) qui sera décrite au chapitre III.

Le sulfate d'ammonium ferrique $Fe(NH_4)\ (SO_4)_2$, 12 OH_2 fut également utilisé à la place du chlorure ferrique (50, 125) mais, tout ce qui se rapporte à la nature et la quantité du catalyseur à employer ne revêt qu'un intérêt secondaire, le dosage du ribose étant, avant tout, fonction de la concentration du réactif en orcinol et en acide chlorhydrique, ainsi que du temps de chauffage : seules l'acidité et la concentration en orcinol du milieu réactionnel interviennent sur le développement de la coloration en un temps donné (124).

Finalement, ces techniques peuvent être complétées par l'extraction du pigment coloré par l'alcool butyrique (123) ou l'alcool isoamylique (29, 153) avec, comme conséquence l'augmentation de la sensibilité par concentration du pigment.

La spécificité de la réaction à l'orcinol, quelle que soit la méthode utilisée, reste sujette aux mêmes réserves que les réactions précédemment décrites : la participation du ribose nucléique est incomplète et l'ADN interfère à environ 10 p. cent. La stabilité, en milieu acide, des liaisons osidiques existant entre le ribose et les bases pyrimidiques rend très difficiles l'isolement et, par suite, le dosage colorimétrique du ribose, des nucléosides et des nucléotides correspondants qui ne fournissent que 3 à 10 p. cent de la coloration totale (12, 90, 130) ; inversement, les nucléotides puriques, facilement hydrolysables dans ces conditions, sont les principaux supports de la réaction furfuralique de BIAL.

De ce fait, l'étalonnage de toutes les réactions colorées de l'ARN reste un point délicat dû, en partie, à la participation incomplète du ribose et surtout à la variabilité de la composition en bases des ARN : ces méthodes mesurent principalement le pentose lié aux bases puriques et leur valeur est limitée par les variations du rapport purine/pyrimidine dans des ARN de sources différentes. Il est donc nécessaire d'utiliser comme étalon, un ARN de même origine et préparé dans les mêmes conditions que l'ARN étudié.

Ces difficultés ont conduit de nombreux auteurs à tenter de scinder les nucléotides pyrimidiques en milieu acide par divers traitements préalables. La stabilité de ces nucléotides due à la présence dans le cycle pyrimidique de la double liaison unissant les carbones 4 et 5, peut être fortement réduite, soit par la saturation de cette double liaison par le brome (119) ou l'hydrogène (34, 81), soit par la rupture de la liaison osidique sans porter atteinte à la molécule du sucre (91). Le traitement à l'hydrate d'hydrazine de BARON et BROWN (10) s'est révélé une excellente méthode pour séparer les bases pyrimidiques des nucléosides et des nucléotides correspondants : ainsi, l'uracile et la cytosine des ribonucléotides ont été respectivement décomposés en pyrazolone et en 3 -aminopyrazole avec libération des esters phosphoriques du ribose. La réduction des nucléotides pyrimidiques par l'amalgame de sodium (80) est plus simple que l'hydrogénation selon le procédé de COHN et DOHERTY (34), mais ces différents procédés, comme les traitements par l'eau de brome de MASSART et HOSTE (119), se sont révélés très efficaces : la coloration fournie par les nucléotides pyrimidiques est quantitative tandis que ces traitements n'altèrent nullement l'action de l'orcinol sur les nucléotides puriques. Le traitement préalable que doit subir l'échantillon d'ARN, s'il se justifie, rend néanmoins ces méthodes très laborieuses, ce qui explique, peut-être, qu'elles n'ont pas été très largement utilisées.

4- Autres réactions colorées.

La réaction du ribose ou de l'ARN avec l'anthrone, telle qu'elle est décrite par BAILEY (7) est moins sensible que la réaction à l'orcinol et ne présente, par ailleurs, aucun avantage spécial.

STARON et Coll. (158, 159) viennent de publier deux techniques de dosage du ribose par combinaison de ce sucre avec le 3,5 diméthylphénol et surtout le chloro-4-métacrésol. Les réactions colorées ainsi obtenues sont aussi sensibles et, semble-t-il, beaucoup plus spécifiques que les réactions à l'orcinol. Cependant, ces techniques trop récentes ne sont pas encore largement répandues et les résultats communiqués méritent d'être confirmés.

En conclusion, il apparaît que de toutes ces réactions colorées du pentose, la réaction à l'orcinol est une des plus sensibles. Aussi l'avons-nous choisie, pour le dosage de l'ARN dans l'ADN.

La technique retenue est celle de MOULE (126) dont l'adaptation en microméthode permet de doser de très faibles quantités d'ARN dans l'ADN.

- CHAPITRE III -

DOSAGE COLORIMETRIQUE DU RIBOSE, DES RIBONUCLEOTIDES ET DE L'ARN PAR LA REACTION A L'ORCINOL

I- PRINCIPE -

Le furfural, produit de déshydratation du ribose en présence d'un acide concentré, combiné à l'orcinol (3-5 dihydroxytoluène), donne une coloration verte ; cette réaction est dite réaction de BIAL (14). Elle a fait l'objet de nombreuses adaptations quantitatives permettant le dosage du ribose et de l'ARN (Chapitre précédent).

La technique retenue (126) ainsi que notre microméthode s'effectuent en présence de chlorure cuivrique. La coloration verte obtenue présente un maximum d'absorption à 665 millimicrons.

L'étalonnage de cette réaction reste délicat du fait qu'il n'existe aucun facteur constant de proportionnalité, pour l'ARN, entre le ribose nucléique total et le ribose qui entre en réaction avec l'orcinol. Aussi avons-nous préféré étalonner cette réaction par rapport à la teneur en phosphore de l'AN testé. Dans ces conditions, la valeur de la courbe étalon dépend de l'absence d'impuretés phosphorées dans l'ARN standard.

II- REACTIFS -

R.1 - Orcinol Merck

R.2 - Acide chlorhydrique fumant R.P. (D. 1,19)

R.3 - Chlorure cuivrique : $CuCl_2$, 2 OH_2

R.4 - Solution de chlorure cuivrique dans l'acide chlorhydrique concentré :

$CuCl_2$, 2 OH_2 . . . . 9 mg
ClH R.P. . . . . 100 ml

Ce réactif se conserve bien à l'abri de la lumière.

R.5 - Solution d'orcinol à préparer extemporanément :

Orcinol . . . 5 mg/ml du Réactif R.4
(stabilité : 1 heure)

Les caractéristiques des différents ARN testés sont rassemblés dans le Tableau III, page 32.

III- MODE OPERATOIRE -

1°- Technique de MOULE (126) -

Dans un tube de 30 ml bouchant à l'émeri, introduire 2 ml de la solution à doser contenant de 1 à 30 microgrammes de ribose ou 1 à 10 microg de phosphore ribonucléique (ARN-P) puis 2 ml du réactif à l'orcinol R.5. Faire un témoin réactif avec 2 ml du solvant de l'ARN (solution de ClNa 0,14 M, ou acide perchlorique 0,5 M) ou 2 ml d'eau distillée dans le cas du ribose, additionnés de 2 ml du réactif R.5. Porter 20 minutes au bain-marie bouillant. Refroidir sous eau froide. Mesurer la densité optique au spectrophotomètre BECKMAN ou JOBIN-YVON dans une cuve de 10 mm à 665 millimicrons, coloration stable. Se reporter à la courbe étalon (figure 10, ci-dessous).

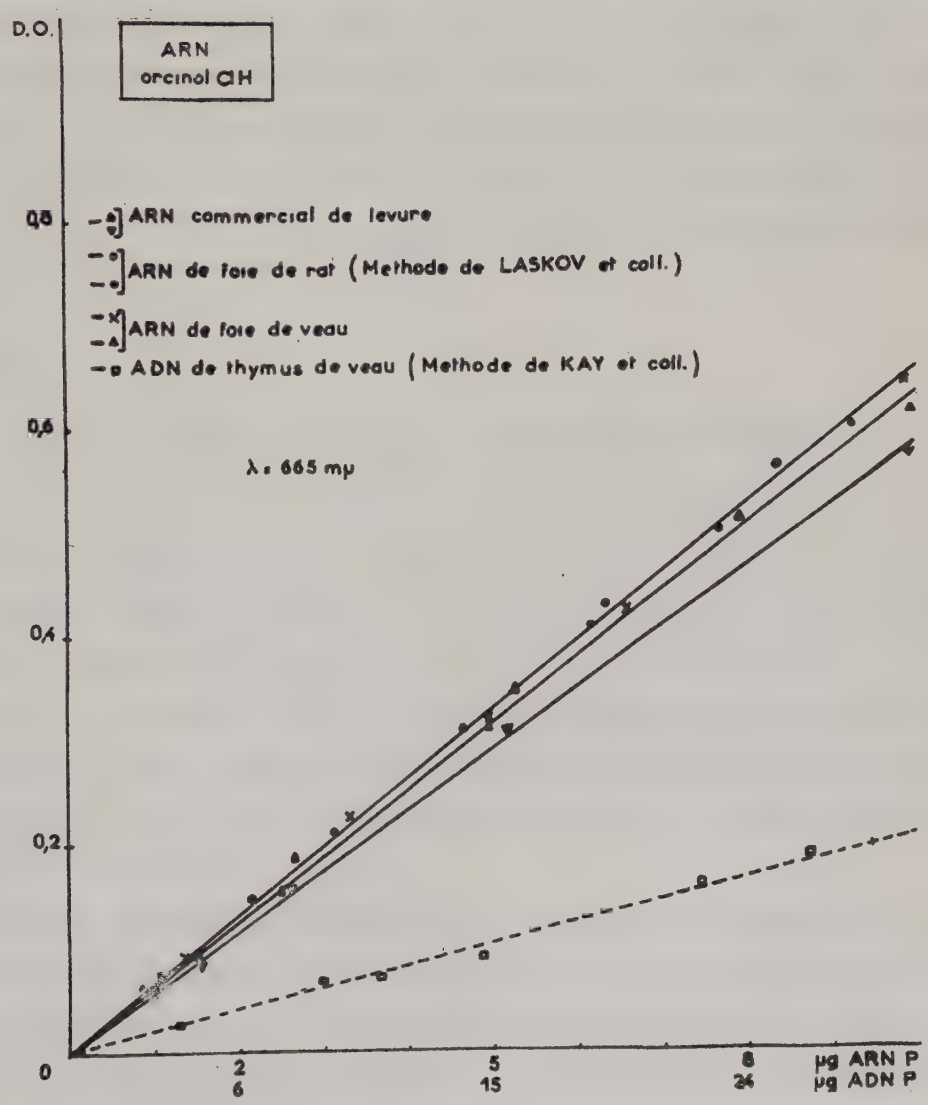


Figure 10

Courbe d'étalonnage de différents ARN (Comparaison à l'ADN).

2°- Microméthode -

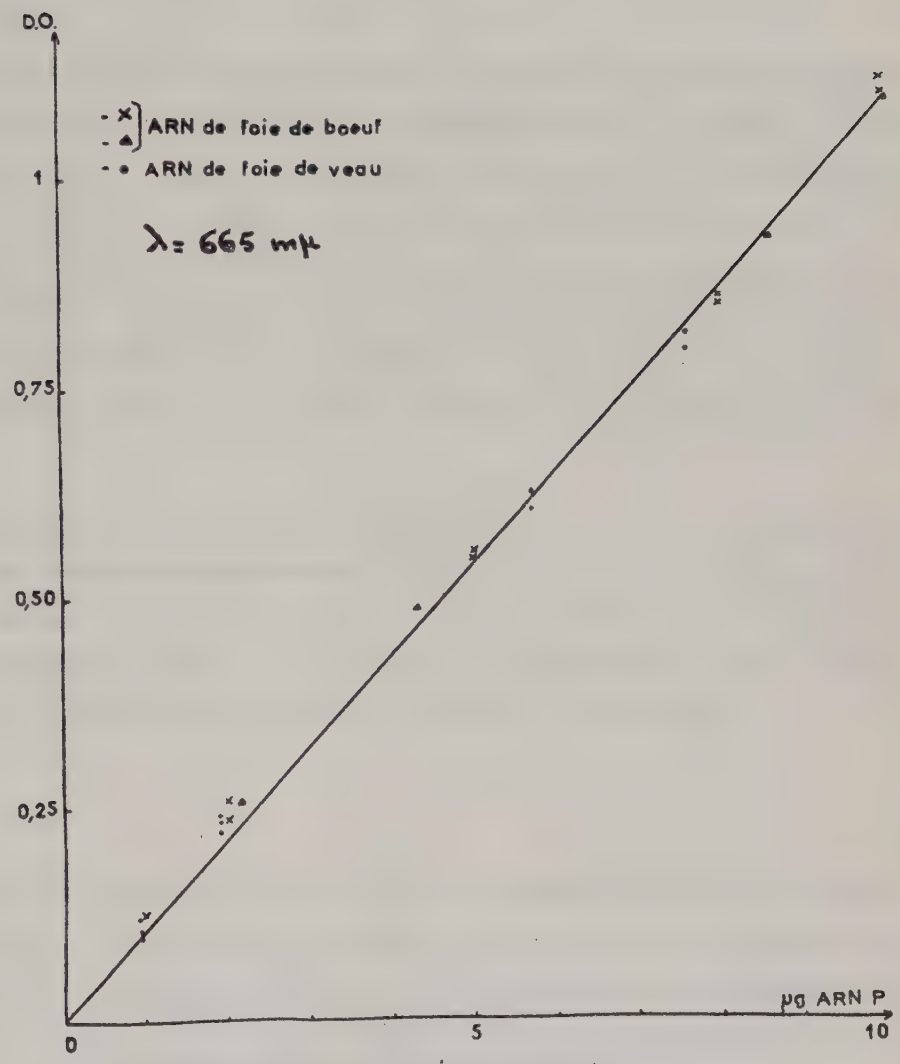
Verser dans un tube à hémolyse 0,5 ml de la solution à doser contenant les mêmes quantités de ribose ou d'ARN que précédemment puis 0,5 ml de réactif R.5. Les tubes bouchés sont portés 30 minutes au bain-marie à 80° C (± 0°5) mais peuvent y être maintenus 45 ou 60 minutes selon la sensibilité que l'on désire obtenir. Après refroidissement, la densité optique est lue à 665 millimicrons dans une microcuve de 10 mm de traversée ayant une contenance de 0,8 ml. Cette lecture se fait contre un témoin réactif traité de façon identique et constitué de 0,5 ml du solvant de l'ARN plus 0,5 ml du réactif R.5.

Il est possible d'effectuer ces mêmes lectures, sans avoir recours aux microcuves, en ajoutant dans chaque tube 1,5 ml d'eau distillée et en lisant dans les cuves précédemment utilisées (contenance 3,5 ml) ; compte tenu de la dilution, les densités optiques obtenues sont sensiblement les mêmes que celles lues en microcuve (Tableau VIII, page 64). Par simple report à la courbe étalon (fig. 11, page 59) on déduit de ces valeurs la teneur en phosphore nucléique de la prise d'essai d'ARN.

IV- ETALONNAGE -

Une des plus grandes difficultés de ces méthodes réside dans le calcul de la teneur en ARN présent d'après la teneur en pentose que l'on a trouvée ; il n'existe, en effet, aucun facteur constant de proportionnalité, pour l'ARN, entre le ribose nucléique total et le ribose qui entre en réaction avec l'orcinol, après destruction de la molécule nucléique : la participation du ribose de l'ARN a été évaluée à 40 p. 100 par CORI (37), 47 p. 100 pour BELJANSKI (12) et MOULE (126), 60 p. 100 pour OGUR-ROSEN (129), et 65 p.100 pour SCHNEIDER (143). Nous avons, personnellement, trouvé pour les ARN de foie de veau une participation des nucléotides de 54 p. 100 et ceci indépendamment de la technique utilisée.

En effet, nous savons d'après la structure d'un ribonucléotide qu'à 1 microgramme de phosphore nucléique correspondent 4,8 microgrammes de pentose ; c'est-à-dire que, si la participation du pentose était totale, les densités optiques correspondant à chacun de ces composés seraient égales.



DOSAGE DE L'ARN EN MICROMETHODE PAR LA REACTION A L'ORCINOL . 80°C 30 minutes
lecture à 665 mμ en microcuve (10 mm de traversée)

Figure 11

Les valeurs consignées dans les tableaux VI et VII page 61 et 62 montrent qu'à 1 microg. de phosphore nucléique correspondent, en fait, 2,6 microg de ribose, ce qui équivaut à une participation du sucre légèrement supérieure à la moitié du ribose total.

Le ribose, ainsi dosé, provient essentiellement des nucléotides puriques (12) dont la proportion varie elle-même notablement selon l'origine et la méthode de préparation de l'ARN. Il est donc nécessaire, si l'on désire une grande précision, de tracer une courbe étalon avec un ARN de même origine et préparé dans les mêmes conditions que l'ARN dosé, en portant en abscisses les concentrations en phosphore déterminées selon la technique de TRUHAUT et Coll. (Chapitre I) et en ordonnées les densités optiques correspondantes. La valeur de la courbe étalon dépend alors, de l'absence d'impuretés phosphorées dans l'ARN standard.

Les ARN de foie de mammifères fournissent par la technique classique ou en microméthode des résultats concordants (Tableaux VI et VIII) tandis que des valeurs plus faibles sont obtenues lors du dosage d'ARN de levure (Tableau VI) dont la participation du ribose, calculée comme précédemment, n'est plus que de 48 p. 100 pour l'ARN Merck et de 51 p. 100 pour l'ARN N.B.C.

V- SENSIBILITE -

La réaction à l'orcinol, telle qu'elle est pratiquée par MOULE, est d'une grande sensibilité : elle permet, en effet, le dosage de 1 à 10 microg. d'ARN-P (fig. 10, page 57). D'exécution simple, cette technique est applicable au dosage de l'ARN dans l'ADN, mais ne permet pas d'estimer des contaminations inférieures à 0,25 p. 100 (IIIème partie - Chapitre III).

Aussi nous a-t-il paru nécessaire de l'adapter en microméthode en réduisant, d'une part, le volume du milieu réactionnel, et en établissant, d'autre part, les conditions optimales d'utilisation.

a) Réduction du volume en réaction :

Le volume du milieu réactionnel a été ramené de 4 à 1 ml, c'est-à-dire que la prise d'essai (1 à 10 microg d'ARN-P) occupe, cette fois, un volume de 0,5 ml auquel on ajoute 0,5 ml du réactif à l'orcinol précédemment utilisé.

Dans ces conditions, bien que la quantité d'orcinol présente soit, par rapport à l'ARN, 4 fois plus faible qu'auparavant, elle est encore suffisante pour permettre le développement de la coloration.

b) Influence de la température et du temps de chauffage :

A 70°C, il ne se développe aucune coloration au bout de 10, 15 ou 30 minutes car, semble-t-il, si ces conditions conviennent à l'hydrolyse même partielle des nucléotides puriques, elles ne permettent pas la conversion du ribose en furfural.

A 80°C, la coloration développée au bout de 30 minutes est reproductible et permet le dosage de 0,5 à 0,8 microg. d'ARN-P, la participation du ribose nucléique restant de l'ordre de 54 p. 100 pour les ARN de foie de veau (comparer les tableaux VII et VIII, pages 63 et 64).

En maintenant le chauffage à 80°C 45 minutes, l'intensité de la coloration est pratiquement doublée pour les concentrations en ARN-P inférieures à 5 microg., tandis qu'au-delà de cette valeur limite, elle n'est plus directement proportionnelle à la concentration (figure 12, ci-dessous) ; en opérant dans ces conditions, on peut doser de 0,25 à 5 microg. d'ARN-P.

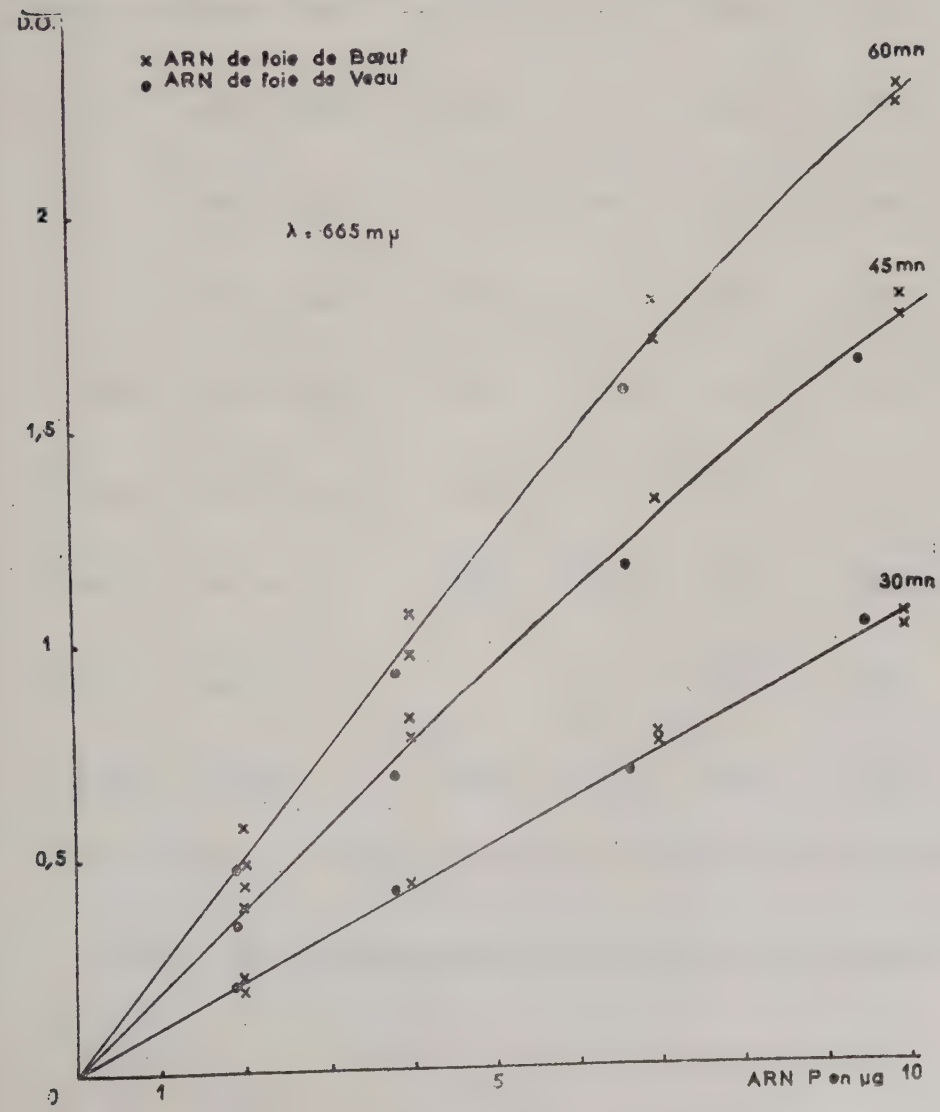


Figure 12

Réaction de l'ARN avec Orcinol ClH à 80°C (microméthode)

Influence du temps de chauffage.

- T A B L E A U VI -

DOSAGE DE L'ARN PAR LA REACTION A L'ORCINOL
(Technique de MOULE)

- Variations des densités optiques à 665 millimicrons en fonction de l'origine de l'ARN -

A R N		Microgrammes de P. Nucléique					
Réf.	Origine	1	2	4	6	8	10
F_2A	Foie (rat)	0,065	0,130	0,265	0,390	0,520	0,650
F_2A	Foie (rat)	0,065	0,135	0,260	0,390	0,515	0,655
F_2A (*)	Foie (rat)	0,065	0,130	0,255	0,375	0,505	0,635
F_5	Foie (rat)	0,070	0,140	0,290	0,420	-	0,680
F_6	Foie (boeuf)	0,070	0,145	0,260	0,390	0,515	0,645
F_7	Foie (boeuf)	0,075	0,140	0,260	0,385	0,520	0,640
INRA	Foie (veau)	0,075	0,140	0,250	0,390	0,515	0,645
INRA	Foie (veau)	0,065	0,130	0,260	0,370	0,520	0,660
NBC	Levure	0,075	0,125	0,250	0,380	-	0,610
NBC	Levure	-	0,120	0,240	0,390	0,505	0,620
Merck	Levure	0,065	0,100	0,240	0,350	-	0,580

(*) Cet ARN a préalablement été hydrolysé par la soude N (18 heures à 37°C).

- T A B L E A U VII -

DOSAGE DU RIBOSE PAR LA REACTION A L'ORCINOL

I - Selon la technique de MOULE
II - En microméthode

RIBOSE en microgrammes		2	5	10	15	20
Densités optiques lues à 665 millimicrons	I	0,050	0,130	0,265	0,390	0,510
		0,055	0,125	0,260	0,385	0,500
	II	0,085	0,240	0,470	0,680	0,880
		0,095	0,220	0,450	0,700	0,890

- TABLEAU VIII -

DOSAGE DE L'ARN PAR L'ORCINOL CHLORHYDRIQUE (Microméthode)

- Variations des densités optiques à 665 mμ en fonction de la température et du temps de chauffage -

Température	Temps de Chauffage	ARN	Microgrammes de P nucléique 1	2	4	8	10
70°C	10 - 15 et 30 min	F_6	illisible				
80°C	30 min.	F_6	*0,115	0,225	0,460	0,890	1,150
			0,115	0,245	0,440	0,860	1,120
			0,125	0,240	0,450	0,865	1,100
		F_7	0,115	0,240	0,445	0,865	1,100
			*0,125	0,250	0,455	0,880	1,150
		INRA	0,110	0,230	0,430	0,860	1,040
			0,120	0,245	0,435	0,870	1,080
			*0,130	0,210	0,430	0,880	1,000
90°C	10 min.	INRA	0,070	0,150	0,275	0,500	0,610
			0,085	0,140	0,320	0,560	0,640
	15 min.	INRA	0,105	0,250	0,445	0,810	1,050
			0,135	0,205	0,500	0,870	1,040
100°C	10 min.	F_6	0,065	0,150	0,340	0,680	0,810
			0,060	0,135	0,370	0,730	0,880
			0,090	0,180	0,350	0,650	0,790
			0,075	0,140	0,315	0,560	0,750

* Lecture en macrocuve après dilution.

Par chauffage à 80°C non plus 45 mais 60 minutes les densités optiques subissent une nouvelle augmentation d'environ 30 p. 100 (fig. 12) mais les limites d'utilisation se situant dans ces conditions entre 0,2 et 4 microg. d'ARN-P, cette modification ne présente aucun avantage sur la technique précédente.

Les dosages pratiqués à 90 et 100° C n'étant pas reproductibles (tableau VIII, page 64), nous avons retenu pour ce dosage en microméthode la température de 80°C qui peut être maintenue 30 ou 45 minutes selon la sensibilité que l'on désire obtenir.

VI- SPECIFICITE -

Ces techniques opératoires ne permettent de doser que le ribose des nucléosides ou des nucléotides puriques, soit environ 50 p. 100 du ribose total, la stabilité en milieu acide des liaisons glucosidiques ribose-uracile et ribose-cytosine rend, en effet, impossible la transformation de ce sucre en furfural et, par suite, sa participation à la coloration finale résultant de la fixation de l'orcinol sur la fonction aldéhyde du cycle furanique.

A ce côté limitatif de la réaction à l'orcinol, il y a lieu d'ajouter une interférence plus ou moins marquée de corps susceptibles d'être extraits en même temps que l'ARN, ce sont : le désoxyribose, l'ADN, le méthylpentose, les acides hexuroniques, les aldo- et les cétohexoses et les aldo-pentoses.

De tous ces corps, le plus gênant est l'ADN qui nécessite, au cours du dosage de l'ARN dans l'ADN, soit d'établir l'importance exacte de l'interférence de l'ADN, soit de séparer quantitativement au préalable l'ARN de l'ADN.

L'interférence de l'ADN sera étudiée dans la IIIème partie de ce travail.

En conclusion, il apparaît que la réaction à l'orcinol, simple et sensible, permet, bien que son étalonnage soit délicat, d'obtenir des résultats qui concordent avec ceux fournis par le dosage du phosphore ou par le dosage spectrophotométrique des bases.

- CHAPITRE IV -

TECHNIQUES PERMETTANT LE DOSAGE SPECIFIQUE DE L'ADN

1°- Dosage de la Thymine -

Après copulation avec l'acide paradiazobenzène-sulfonique en solution dans CO_3Na_2, la thymine par addition de soude et d'hydroxylamine donne une coloration rouge (réaction d'HUNTER) (87) qui en a permis le dosage dans des hydrolysats d'ADN (133, 176). Cette réaction ne permet, en fait, qu'une mesure semi-quantitative de la thymine ; la copulation de cette base avec le diazoréactif est incomplète tandis que l'uracile et la cytosine interfèrent (39). D'après les travaux de DAY (39), la spécificité de la réaction est accrue en opérant sous atmosphère d'oxygène et en remplaçant l'hydroxylamine par le glycérol : la coloration rouge obtenue, stable et intense, permet de doser 20 microgrammes de thymine par ml.

L'utilisation de ces techniques nécessite, lorsqu'on opère sur des hydrolysats d'ADN, de précipiter les purines par un sel de cuivre ou le chlorure de palladium et d'éliminer les produits de dégradation du désoxyribose (acide lévulinique) par l'éther. Ces extractions, toujours laborieuses, rendent préférables le dosage fluorométrique de la thymine selon la technique de ROBERTS et FRIEDKIN (135).

La thymine et tous les composés qui en contiennent, hydrolysés en milieu alcalin après traitement par l'eau de brome, conduisent à la formation d'acétol (hydroxyacétone) à partir du noyau 5-méthylpyrimidine commun à tous ces corps ; la condensation de l'acétol, ainsi formé, avec l'ortho-aminobenzaldéhyde entraîne la formation de la 3-hydroxyquinaldine dont la très grande fluorescence permet de doser avec un appareil spécialement adapté jusqu'à 50 millimicrogrammes d'ADN.

Cette technique fluorométrique convient parfaitement au dosage de l'ADN de tissus variés, des virus et des microorganismes mais nécessitent pour son utilisation un appareillage coûteux et de manipulation délicate.

2°- Dosage du désoxyribose -

Le désoxyribose se prête à de nombreuses combinaisons permettant son dosage colorimétrique : en milieu acide, il forme des complexes colorés avec la diphénylamine, la cystéine, l'indole, le tryptophane, le carbazole, la nitrophénylhydrazine et l'anthrone.

Le mécanisme de ces réactions colorimétriques est fort complexe : tantôt la fonction aldéhyde du désoxyribose ou d'un composé intermédiaire obtenu par dégradation acide (vraisemblablement l'aldéhyde ω-hydroxylévulinique) se combine avec la diphénylamine, le tryptophane ou l'indole ; tantôt c'est un produit de déshydratation du 2-désoxyribose, l'alcool furfurylique (figure 8) qui est à la base de la réaction colorée (46)

Les principales méthodes de dosage colorimétrique proposées dans la littérature sont rassemblées dans le tableau IX, page 68).

a) Réaction à la diphénylamine.

La méthode la plus utilisée pour le dosage du désoxyribose est la réaction à la diphénylamine décrite par DISCHE en 1930 qui, sous sa forme originale, permet de doser de 50 à 500 microgrammes d'ADN et de 1 à 2 microgrammes d'ADN en microméthode (160). Dans les deux cas, l'échantillon d'ADN est chauffé 10 minutes à 100° C avec la diphénylamine en solution dans un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique ; la coloration obtenue est stable (4).

Récemment, BURTON (26) a modifié ce réactif par apport complémentaire d'acétaldéhyde ; au bout de 16 à 20 heures à la température ambiante, il se développe une coloration bleue dont l'intensité rend ce procédé cinq fois plus sensible que la technique initiale. NIGON et DAILLIE (127), en utilisant cette technique en microméthode, sont parvenus à doser de 0,3 à 1,8 microgramme d'ADN.

Dans les conditions habituelles, la coloration ne se développe qu'à partir des nucléotides puriques dont la liaison sucre-base purique est aisément rompue en milieu acide ; après bromation préalable, selon le procédé de BRADY et McEVOY-BOWE (19), il est cependant possible de faire intervenir dans la réaction le désoxyribose des nucléotides pyrimidiques dont la liaison osidique sucre-base, rendue labile par ce traitement antérieur, ne subsiste plus en milieu acide.

- TABLEAU IX -

PRINCIPALES METHODES COLORIMETRIQUES OU FLUOROMETRIQUES DE DOSAGE DU DESOXYRIBOSE ET DE l'ADN

Réactifs	DIPHENYLAMINE		CYSTEINE		INDOLE	p.NITROPHENYL-HYDRAZINE	TRYPTOPHANE	Ac.THIOBARBI-TURIQUE	Ac.DIAMINO-BENZOIQUE
Références	DISCHE (46)	BURTON (26)	STUMPF (162)	DISCHE (45)	CERIOTTI 28	WEBB-LEVY (170)	COHEN (33)	WARAVDEKAR et SASLAW (168)	KISSANE et ROBINS (100)
Conditions de mise en oeuvre	CH_3COOH SO_4H_2 100° 10 min.	CH_3COOH SO_4H_2 $+CH_3CHO$ 16 heures	SO_4H_2 75 p.100 20-30° 15 min.	SO_4H_2 conc. 20-30° 24-48 h.	ClH 100° 10 min. Extraire par $CHCl_3$	CCl_3COOH 100° 20 min.	ClO_4H 100° 10 min.	CCl_3COOH 100° 20 min.	ClO_4H 60° 30 min.
Sucre dosé	Désoxyribose lié aux bases puriques						Désoxyribose total	Désoxyribose lié aux bases puriques	
Sensibilité (microg ADN)	50	5	25	50	2,5 microméthode : 0,1	10	100	0,2 (désoxyribose)	2,4 10^{-3}
Interférence avec :	Désoxypentoses Protéines		2-désoxyhexoses	Nombreux sucres	Fructose Arabinose ARN(1 p.100)		Nombreux sucres et aldéhydes		Fractions tissulaires acidosolubles et lipidiques
Avantages	Simple	Simple Sensible Très reproductible	Simple Très reproductible		L'extraction chloroformique élimine l'interférence des sucres et protéines	Aucune interférence avec les protéines	Dosage du désoxyribose total	Sensible pour dosage désoxyribosides et désoxyribotides	Très sensible
Inconvénients	Peu spécifique	Réaction longue, inhibée par le PAS et perturbée par le phénol		Peu spécifique ; longue	Peu spécifique; laborieuse	Coloration instable	Peu spécifique	Sensibilité plus faible lors du dosage ADN polymérisé	Peu spécifique si l'on opère sans précaution.

La plupart des sucres interfèrent avec la réaction de DISCHE, mais donnent des colorations différentes ; lorsque ces substances, en grande quantité, masquent la coloration bleue du désoxyribose, il y a lieu de procéder à une lecture dichromatique à 595 et à 650 millimicrons (46).

En opérant à la température ambiante en présence d'acétaldéhyde (réaction de BURTON) (26), il apparaît au début de la réaction (1 h.) une coloration pourpre qui devient bleue après 7 heures de contact, le maximum d'absorption passe alors de 560 à 600 millimicrons.

Des études de DERIAZ et Coll. (42) sur le mécanisme de la réaction de DISCHE à 100° C, il ressort que, parmi les six composés révélés par chromatographie, seul le complexe constitué par l'aldéhyde ω-hydroxybévulinique et la diphénylamine, représentant IO p. cent des produits de la réaction, serait responsable de la coloration bleue.

b) Réaction à l'indole.

Cette réaction du désoxyribose avec l'indole, initialement décrite par DISCHE (46) et modifiée par CERIOTTI (28) permet de doser au minimum 2,5 microgrammes d'ADN dans des conditions normales d'utilisation et 0,1 ou 0,2 microgrammes en microméthode (I8,95).

L'ADN en milieu chlorhydrique 3 N, réagit avec l'indole et fournit au bout de IO minutes à IOO°C une coloration jaune dont le maximum d'absorption se situe à 490 millimicrons. Pour éliminer l'interférence des autres sucres (hexoses), le mélange réactionnel est traité par le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone, qui extraient les pigments colorés dus aux substances interférentes et libère dans la phase aqueuse la coloration jaune propre au désoxyribose. Cette séparation n'est pas entièrement sélective notamment pour l'arabinose qui développe en phase aqueuse une coloration brune correspondant à 8 p. cent de la coloration fournie par une égale quantité d'ADN, mais cette interférence de l'arabinose peut être éliminée en remplaçant le chloroforme par l'acétate d'amyle (95).

L'extraction par le chloroforme, purifié (28) ou non (89), est généralement répétée trois fois, il est possible d'opérer en une seule fois avec un plus grand volume de solvant (18) ; l'extraction chloroformique, même unique, constitue de toute façon un sérieux handicap.

c) Réaction à la cystéine.

Il existe deux réactions du désoxyribose avec la cystéine : la première qui s'effectue en milieu sulfurique concentré n'est, en fait, qu'une réaction générale des hydrates de carbone dont les spectres d'absorption diffèrent en fonction de la nature même du sucre, la seconde, beaucoup plus sélective et pouvant être considérée comme étant caractéristique du 2-désoxyribose, s'effectue en milieu sulfurique à 75 p. cent (44). La première réaction permet de doser 10 à 100 ou 50 à 500 microgrammes d'ADN suivant que l'on emploie la technique de BRODY (22) ou celle de DISCHE (46) ; dans aucun des cas il n'y a interférence des protéines, mais la réaction de STUMPF (162) en milieu sulfurique à 75 p. cent est plus sensible (quantité dosable : 25 à 550 microgrammes d'ADN) et surtout plus spécifique.

Remarque.

D'après une observation toute récente de STARON et coll. (157), il apparaît que des extraits trichloracétiques de tissus ou de mycéliums développent au contact de l'acide sulfurique concentré une coloration jaune sans qu'il soit nécessaire d'y adjoindre une substance chromogénique comme la cystéine, par exemple. Cette coloration, spécifique du désoxyribose, n'apparaît que dans des conditions bien précises et permet de doser jusqu'à 10 microgrammes d'ADN.

Cette observation est fort intéressante mais ne saurait, semble-t-il, mettre en doute l'utilisation de diverses substances aromatiques que l'on considérait jusqu'à présent, comme nécessaires au développement des différentes colorations fournies par le désoxyribose.

d) Autres réactions colorées du désoxyribose.

L'ADN réagit avec le tryptophane en milieu perchlorique à 60 p. cent et donne, après passage au bain marie bouillant, une coloration pourpre proportionnelle à la concentration dans l'intervalle de 100 à 500 microgrammes d'ADN.

Ce produit coloré serait, d'après COHEN (33), une base de Schiff résultant de la condensation du désoxyribose ou d'un composé aldéhydique intermédiaire avec l'azote du noyau pyrrole. Lors du dosage de l'ADN, la coloration se développe à partir des nucléotides puriques et pyrimidiques ; il est recom-

mandé d'extraire par l'alcool isoamylique le pigment coloré dû à l'ADN pour le séparer de la coloration fournie par les protéines. Cette technique peu sensible est d'autre part, sujette à l'interférence de nombreux sucres.

WEBB et LEVY (170) ont décrit une réaction relativement spécifique du désoxyribose avec la p-nitrophénylhydrazine ; la zone de sensibilité s'étend de 10 à 300 microgrammes d'ADN. Cette technique laborieuse n'a pas été réutilisée par d'autres chercheurs.

WARAVDEKAR et SASLAW (168) proposent une méthode dans laquelle le désoxyribose, oxydé en aldéhyde malonique par l'acide périodique, donne par condensation avec l'acide thiobarbiturique, une coloration rose qui permet l'évaluation de 0,2 microgramme de désoxyribose. Dans cette technique, il est nécessaire que la fonction aldéhyde du sucre soit libre, il faut mettre en oeuvre une hydrolyse acide douce pour libérer quantitativement ce sucre de ses nucléosides puriques, tandis que, dans les mêmes conditions, les nucléotides pyrimidiques n'abandonnent leur sucre qu'après réduction (77). En faisant varier les conditions d'oxydation (temps de contact et température), SASLAW et WARAVDEKAR (138) peuvent différencier de nombreux composés à désoxyribose.

La réaction à l'anthrone, fournie par le ribose et le désoxyribose dans des conditions très voisines, a permis à GARY et KLAUSMEIER (72) de doser les AN en présence l'un de l'autre, l'ADN donnant une coloration rouge et l'ARN une coloration bleue. Cette technique constitue un excellent test qualitatif, mais appliqué par ces mêmes auteurs, au dosage de mélanges d'AN, ce procédé rapide et relativement simple s'est révélé très imprécis : des mélanges d'AN à 25 p. cent ont fourni des colorations correspondant à 33 p. cent d'ARN dans l'ADN et 39 p. cent d'ADN dans l'ARN.

e) Dosage fluorométrique du désoxyribose.

La technique de KISSANE et ROBINS (100) très sensible et très spécifique consiste à mesurer la fluorescence du composé formé par la combinaison de l'acide 3-5 diaminobenzoïque avec le désoxyribose. La longueur d'onde d'excitation maximale est de 420 millimicrons et correspond à une bande de fluorescence dont l'intensité est maximale à 520 millimicrons.

Cette méthode permet de mesurer jusqu'à 2,4 millimicrogrammes d'ADN mais sa mise en oeuvre est extrêmement délicate.

De toutes ces techniques de dosage du désoxyribose nous avons retenu pour l' ARN la réaction à l'orcinol et pour l'ADN la réaction à la diphénylamine dont l'étude détaillée fera l'objet du chapitre suivant.

- CHAPITRE V -

DOSAGE COLORIMETRIQUE DES DERIVES A BASE DE DESOXYRIBOSE ET DES ADN

(Technique de BURTON)

I- PRINCIPE -

La réaction de DISCHE (46) à la diphénylamine, modifiée par BURTON (26), permet de doser à la température du laboratoire avec une bonne sensibilité le désoxyribose, les composés à base de ce pentose après sa libération par hydrolyse et, par conséquent, les ADN, grâce à la coloration bleue qu'ils donnent avec l'amine, en présence d'acétaldéhyde au bout de 16 à 20 heures.

Le mécanisme de cette réaction colorée est en fait fort complexe : la coloration obtenue résulte de la combinaison de la diphénylamine avec la fonction aldéhyde d'un composé intermédiaire obtenu par la dégradation acide désoxyribose, l'aldéhyde ω-hydroxylévulinique.

II - REACTIFS -

R.1 - Acétaldéhyde pur redistillé (distillation effectuée au bain-marie tiède)

R.2 - Solution aqueuse d'acétaldéhyde à 1,6 g p. 100
(à conserver au réfrigérateur)

R.3 - Diphénylamine Merck

R.4 - Acide sulfurique concentré
(RP pour toxicologie)

R.5 - Acide acétique RP

R.6 - Réactif à la diphénylamine
- Diphénylamine . . . . . 1,5 g
- Acide acétique . . . . . 100 ml
- Acide sulfurique . . . . . 1,5 ml

Conservation à l'abri de la lumière, le réactif doit rester incolore.

R.7 - A préparer lors de l'emploi
- Réactif à la diphénylamine . . . . . 50 ml
- Solution acétaldéhyde 0,25ml

Cette solution doit rester incolore

R.8 - Acide perchlorique 0,5 N
Préparé à partir de l'acide perchlorique concentré RP

III- MODE OPERATOIRE -

I° - Préparation de la solution d'ADN en vue du dosage.

Cette réaction ne pouvant se faire qu'en milieu perchlorique 0,5 N, l'addition de cet acide à la solution d'ADN entraîne la formation d'un trouble qu'on élimine par chauffage au bain marie à 70° C (15 min. sont généralement suffisantes, ne jamais dépasser 30 min), l'ADN hydrolysé repasse alors en solution.

2° - Mise en oeuvre du dosage.

Dans un tube de 10 ml, on verse un volume (1 à 2 ml) de la solution à doser contenant de 1 à 10 microg de phosphore désoxyribonucléique (ADN-P) en milieu perchlorique 0,5 N et deux volumes du réactif R.7, on abandonne de 16 à 20 heures à une température comprise entre 25 et 30° C.

On mesure alors la densité optique au spectrophotomètre à 600 millimicrons dans des cuves de 10 mm de traversée.

Remarques :

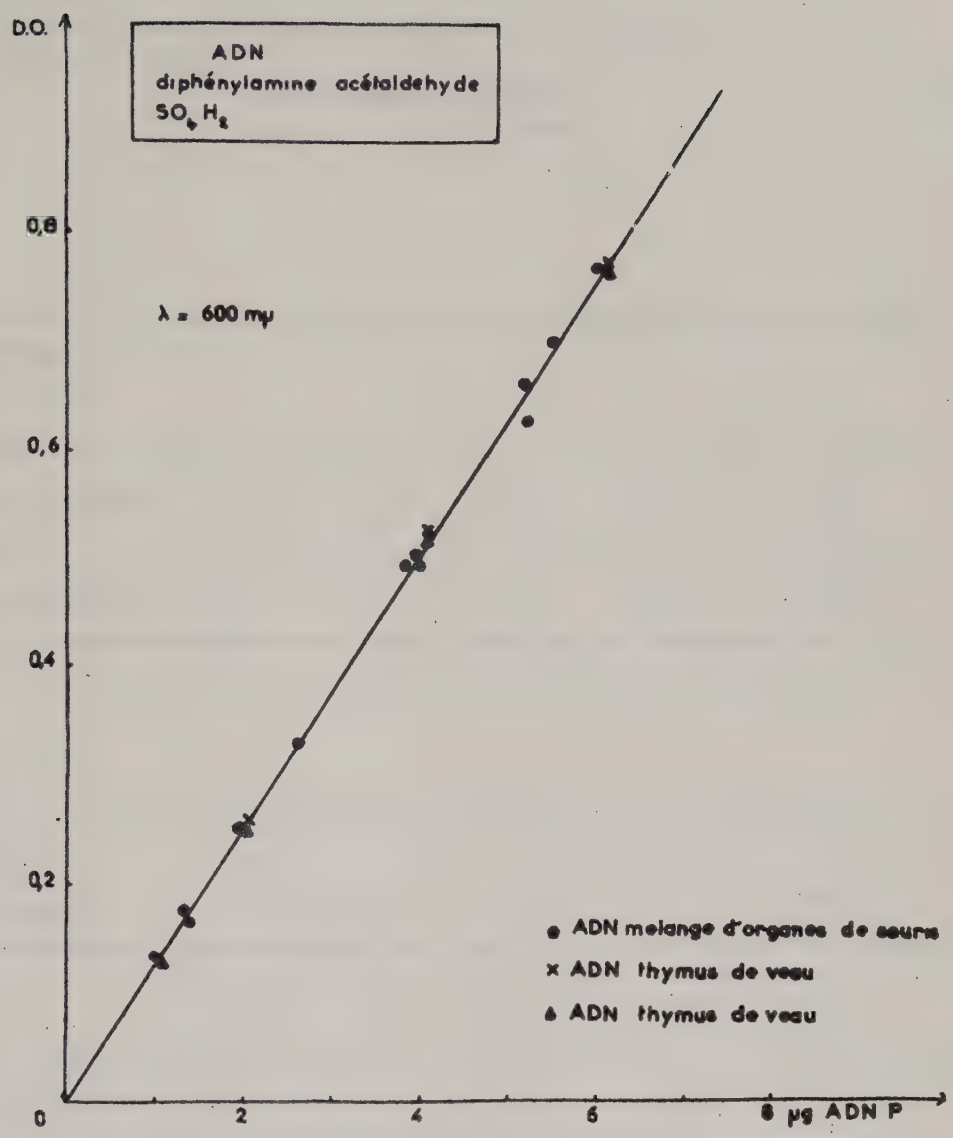
Il est important que tous les tubes restent à la même température pendant que se développe la coloration, mais il n'est pas nécessaire que cette température soit constante. Des variations comprises entre 25 et 35° n'affectent pas l'allure du phénomène.

La concentration de l'acide perchlorique peut varier de 0,25 à 0,65 N sans produire d'effet sensible sur la coloration finale. Par contre, en deçà de 0,05 N et au delà de 1 N, on note une chute de la coloration qui peut atteindre 30 p. cent si la concentration perchlorique du milieu s'élève à 2 N.

IV- ETALONNAGE -

L'étalonnage s'effectue à partir d'un ADN pur ; la courbe étalon est tracée en portant en abscisses les concentrations du phosphore nucléique (ADN-P) déterminées selon la technique décrite précédemment (IIème partie - Chapitre I) et en ordonnées les densités optiques correspondantes (fig. 13, page 75).

La valeur de cet étalonnage dépend de l'absence d'impuretés phosphorées dans l'ADN étalon ; par contre, elle est indépendante de l'origine de l'ADN. Les ADN de thymus de veau V 74 et V 97 et l'ADN S 42 provenant de mélanges d'organes de souris nous ont, en effet, fourni des résultats identiques (tableau X , page 76) à partir desquels nous avons construit notre courbe étalon (fig.13).



COURBE D'ETALONNAGE DE LA RÉACTION DE DISCHE-BURTON

- Figure 13 -

- TABLEAU X -

DOSAGE DU DESOXYRIBOSE ET DE L'ADN PAR LA TECHNIQUE DE BURTON

Désoxyribose en microgrammes	1	2	4	6	10
Densités optiques lues à 600 millimicrons	0,060	0,115	0,235	0,350	0,580
	0,060	0,120	0,225	0,340	0,565

ADN-P en microgrammes	1	2	4	6	Réf.
Densités optiques lues à 600 millimicrons	-	0,260	0,530	0,780	V 74
	0,130	0,255	0,520	0,770	V 97
	0,135	0,255	0,515	0,790	S 42

En comparant ces résultats à ceux fournis par le désoxyribose pur (prise d'essai pour la gamme étalon : 1 à 10 microg), il apparaît qu'à 1 microg d'ADN-P correspondent 2,16 microg de désoxyribose, soit seulement la moitié du sucre normalement contenu dans un désoxyribonucléotide (4,3 microg). La stabilité des liaisons entre les bases pyrimidiques et le désoxyribose , en opposition à la fragilité des liaisons entre les bases puriques et ce même désoxypentose, permet de penser que le sucre révélé provient des nucléotides puriques. La valeur du rapport précédent comparé à l'équimolarité des bases puriques et pyrimidiques dans l'ADN, étaye, d'autre part, cette hypothèse.

Remarque.

La participation du ribose étant la même (50 p. 100) d'un échantillon d'ADN à l'autre, il est possible d'étalonner le dosage de l'ADN par rapport au désoxyribose pur. Mais, dans ce cas, il est nécessaire de diviser par 2,16 la quantité de sucre ainsi dosée pour avoir la correspondance en microg. d'ADN - P.

V- SENSIBILITE -

La modification de BURTON quintuple la sensibilité de la méthode de DISCHE et permet dans les conditions étudiées de doser de 0,5 à 6 microg d'ADN-P. Cette augmentation de la sensibilité est due en partie à l'addition d'acétaldéhyde dont on pourrait penser qu'un apport plus important permettrait de gagner encore davantage en sensibilité. Les essais de NIGON et DAILLIE (127) montrent qu'il n'en est rien ; la quantité d'acétaldéhyde employée correspond bien au maximum de la sensibilité.

Par contre, ces auteurs, pour atteindre l'optimum de sensibilité, augmentent de 0,5 p. 100 la concentration du réactif en diphénylamine (2 au lieu de 1,5), concentration qui, comme l'a observé BURTON influe sur l'intensité de la coloration.

VI- SPECIFICITE -

Des travaux de BURTON sur l'interférence de l'ARN, des sucres et des protéines, il ressort que cette modification est beaucoup plus spécifique que la réaction de DISCHE à 100°C : 5 mg d'ARN donnent la même coloration que 11 microg

d'ADN ce qui ne peut constituer une cause d'erreur lorsqu'on opère sur des ADN en fibres qui ne contiennent généralement que très peu d'ARN ; la plupart des sucres ne produisent de colorations appréciables qu'à des concentrations élevées ; il est donc peu vraisemblable qu'ils puissent perturber les résultats ; seules les protéines, lorsqu'elles sont présentes en grande quantité, fournissent des colorations parasites avec la diphénylamine. Par contre, les amino-acides tels que la glycine, la cystéine, le tryptophane et l'histidine ne donnent aucune coloration détectable à la concentration de 2 mg.

La réaction à la diphénylamine est donc une réaction de choix pour doser l'ADN extrait selon le procédé de SCHNEIDER ou de SCHMIDT-THANNHAUSER. Mais certaines substances comme l'acide para-aminosalicylique (P.A.S.), le phénol, certains liquides biologiques comme l'urine, perturbent notablement le développement de la réaction.

Le P.A.S. inhibe fortement la coloration qui, de bleue, devient jaune entraînant le déplacement du maximum d'absorption de 600 à 500 millimicrons. Les colorations lues à 600 millimicrons sont très faibles et diminuent en fonction de la concentration de P.A.S., comme suit :

ADN testé	P A S ajouté	Coloration obtenue à 600 mμ exprimée en pourcentage de la coloration théorique
4,2 microg ADN-P	0,6 mg	18,3 p. 100
" " "	1,5 "	18,3 "
" " "	3 "	13,6 "
" " "	6 "	12,7 "
" " "	12 "	10 "

Cette inhibition par le P.A.S. rend négatifs tous les dosages d'ADN préparés selon la technique de KIRBY qui utilise le P.A.S. pour faciliter la déprotéinisation des DNP par le phénol.

On a d'autre part constaté une perturbation et même une inhibition de cette réaction, lors du dosage d'ADN préparé par la méthode au phénol et insuffisamment lavé à l'éther. Débarrassé de ces traces de phénol, ces mêmes ADN redonnent une coloration normale, mettant ainsi en évidence la nécessité de procéder à un lavage soigneux de tels ADN avant d'effectuer cette détermination colorimétrique.

Les urines renferment un inhibiteur non identifié mais moins puissant que le P.A.S. Après addition de différents volumes d'urine à 4,2 microg d'ADN-P nous avons obtenu les colorations suivantes :

Volume d'urine en ml	0,05	0,1	0,2	0,5
Coloration obtenue à 600 mμ , exprimée en pourcentage de la coloration théorique	(1) 77 p.100	63 p.100	63 p.100	49 p.100
	(2) 71 p.100	59 p.100	49 p.100	43 p.100

(1) urine humaine
(2) urine de porc
) préalablement déféquées par le réactif de COURTONNE

On voit donc que pour avoir des résultats exacts il est nécessaire de travailler sur des urines fortement diluées, ce qui constitue un sérieux obstacle lorsqu'on se propose d'y doser les nucléotides de leurs produits de dégradation.

Le dosage de l'ADN et des polydésoxyribonucléotides dans le plasma par cette réaction colorée ne soulève aucune difficulté particulière. Il convient de précipiter les protéines plasmatiques par l'acide perchlorique à 10 p.100, l'hydrolyse de ce culot (2 hydrolyses de 30 minutes à 70°C) par l'acide perchlorique 0,5 N libère ensuite le désoxyribose que l'on dose comme précédemment.

Les expériences pratiquées in vitro nous ont permis de doser en totalité l'ADN ajouté au plasma. Cette technique fidèle permet d'étudier la disparition de l'ADN injecté à des mammifères (lapins, souris) mais ne permet pas de doser moins de 1 microg d'ADN-P par ml de plasma.

o
o o

TROISIEME PARTIE

- - - - -

DOSAGE DES IMPURETES A BASE DE RIBOSE ET DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DANS LES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES

* * * * * *

Les méthodes de préparation des AN (Ière partie page 22) ne permettant pas de séparer totalement ces deux polynucléotides, tous les ADN extraits des tissus animaux ou des microorganismes contiennent des traces d'ARN. Cette contamination peut être très gênante du strict point de vue analytique, mais aussi, significative sur le plan biochimique quand on essaie d'établir la spécificité du pouvoir biologique de l'ADN.

En effet, à côté des ADN bactériens, dits transformants, certains ADN viraux (ADN de bactériophages (122, 137, 145), ADN des virus du polyome (5,43), du papillome de Shope (92) et du virus SV40 (16,74)) sont doués d'une activité biologique spécifique décelable par nos moyens expérimentaux actuels ; parallèlement, la liste des ARN viraux infectieux (64,75) va sans cesse en augmentant.

Il est donc important de vérifier la pureté d'un ADN et notamment l'absence d'ARN actif, si l'on désire s'assurer de la spécificité de son action. Généralement, l'emploi d'enzymes spécifiques (désoxyribonucléase et ribonucléase) suffit pour établir sans équivoque la spécificité du facteur infectant ; néanmoins, il est toujours utile de procéder au dosage des AN, en présence l'un de l'autre, par l'une des réactions spécifiques de l'un des éléments qui les différencient : le désoxyribose et la thymine pour l'ADN, le ribose et l'uracile pour l'ARN.

Du fait que l'ARN n'interfère ni dans la plupart des réactions colorimétriques du désoxyribose ni dans le dosage fluromètrique de la thymine (IIème partie p. 66), le dosage des impuretés désoxyribonucléiques dans l'ARN ne présente aucune difficulté particulière.

Par contre, s'il s'agit de caractériser l'ARN en présence d'ADN, il apparaît de nombreuses difficultés dues au fait que les réactions classiques du ribose sont également fournies par le désoxyribose tandis que la cytosine, composant commun à l'ARN et à l'ADN, interfère dans la détermination colorimétrique de l'uracile. Cette dernière méthode de dosage de l'ARN nécessite la fixation préalable de la cytosine sur résines échangeuses d'ions mais ne saurait convenir au dosage de très faibles quantités d'ARN dans l'ADN qui devront donc être déterminées par l'une des réactions colorimétriques du ribose.

Le dosage de l'ARN dans l'ADN, ainsi assimilable au dosage du ribose en présence de désoxyribose, nécessite, soit d'établir exactement l'importance de l'interférence de l'ADN dans la détermination colorimétrique de l'ARN, le grand excès d'ADN en réaction limitant de toute façon cette méthode de dosage direct, soit de séparer quantitativement au préalable l'ARN de l'ADN (méthode de dosage indirect), la faible quantité d'ARN rendant cette opération délicate.

Nous décrirons, ainsi, dans cette troisième partie, l'ensemble de nos recherches expérimentales qui nous ont permis de préciser les conditions optimales de ces deux méthodes de dosage de l'ARN dans l'ADN.

Dans un premier chapitre, consacré à la méthode directe, nous étudierons successivement les réactions colorées que fournit l'ADN avec certains chromogènes normalement utilisés pour le dosage de l'ARN. Ayant ainsi déterminé le degré d'interférence de l'ADN dans ces réactions colorimétriques de l'ARN, nous procèderons au dosage de l'ARN dans des mélanges d'AN en quantités connues pour préciser les possibilités d'une telle méthode de dosage.

Après avoir choisi une méthode de séparation convenable dont nous contrôlerons l'efficacité en procédant à des expériences de surcharge d'ADN en ARN, nous effectuerons dans le second chapitre le dosage séparé de chacun des AN, ce procédé constituant ce que nous avons appelé la méthode de dosage indirect.

Nous présenterons finalement nos conclusions quant à ces recherches en précisant les limites d'emploi de chacune de ces méthodes.

- CHAPITRE I -

DOSAGE DIRECT DE L'ARN DANS L'ADN

I- PRINCIPE -

Si l'on effectuait sur un échantillon d'ADN l'une des réactions colorées du ribose, la coloration obtenue, du fait de la participation plus ou moins importante du désoxyribose dans la détermination colorimétrique du ribose, ne saurait correspondre à l'ARN présent et ce dosage perdrait toute sa signification.

Pour corriger cette erreur inhérente aux techniques utilisées, il est nécessaire d'étudier dans un premier temps l'interférence de l'ADN ; cette interférence étant établie, il sera alors possible de déduire de la coloration totale la quantité d'ARN présente.

Pour qu'une telle technique soit utilisable, il faut d'une part que l'interférence de l'ADN dans la réaction colorée choisie soit faible de façon à pouvoir utiliser ce matériel en quantité convenable, et, d'autre part que la sensibilité de cette réaction vis à vis de l'ARN soit suffisamment grande pour permettre le dosage de faibles quantités d'ARN.

Ces impératifs nous ont amenés à étudier l'interférence de l'ADN dans les deux réactions colorées de l'ARN actuellement les plus sensibles : la réaction au phloroglucinol telle qu'elle est décrite par BOLOGNANI et coll. (17) et la réaction à l'orcinol (IIème partie, chap. III).

II- ETUDE DE LA REACTION COLOREE ENTRE L'ADN ET LE PHLOROGLUCINOL -

Dans le but d'éliminer toute contamination ribonucléique, les ADN font l'objet d'un traitement préliminaire qui consiste à traiter ces polymères par la soude normale qui dégrade l'ARN en nucléotides acido-solubles sans affecter l'ADN de la même façon ; quand on acidifie le liquide alcalin de digestion, l'ADN est précipité en même temps que les protéines tandis que le liquide surnageant acide contient les ribonucléotides acido-solubles (cette technique de séparation des AN est très efficace et fera l'objet d'une étude détaillée à la fin de cette troisième partie). Les précipités d'ADN sont, alors, redissous à 70° C dans ClO_4H 0,5 N et constituent ainsi, le matériel d'étude de la réaction colorée ADN-phloroglucinol.

1°- Réactifs :

R.1 - ClH fumant R.P. (d 1,19)
R.2 - CH_3COOH cristallisable R.P.
R.3 - Solution aqueuse de glucose à 0,8 p. 100

R.4 - Solution alcoolique de phloroglucinol (1, 3, 5 trihydroxybenzène) :
phloroglucinol R.P. . . . 5 g
alcool éthylique à 95° . . 100 ml.

R.5 - Réactif 5 - Réactif au phloroglucinol à préparer extemporanément :
ClH . . . . . (R.1) . . . 2 ml
CH_3COOH . . . . . (R.2) . . . 110 ml
Solution de glucose (R.3) . . . 1 ml
Solution de phloroglucinol R.4) . 5 ml

Les caractères analytiques des AN étudiés : ADN V61 et V74, ARN F7 et IHRA, sont rassemblés dans les tableaux III et IV (voir pages 32 et 33).

2°- Mode opératoire -

Dans un tube de 30 ml bouchant à l'émeri, introduire 0,5 ml de la solution à doser contenant de 10 à 100 microgrammes d'ADN-P et 0,5 ml de ClH concentré (R1). Après agitation, ajouter 4,5 ml de réactif au phloroglucinol (R5) et porter 5 minutes au bain marie bouillant. Refroidir et maintenir dans la glace jusqu'à lecture de la coloration à 552 et à 510 millimicrons contre un témoin obtenu dans les mêmes conditions en remplaçant la solution à doser par le solvant de l'ADN (ClO_4H 0,5 N).

La différence entre les valeurs obtenues à ces deux longueurs d'onde correspond à l'absorption de l'ADN seul ; elle est rapportée à la teneur en phosphore de cet échantillon.

3°- Résultats -

La faible coloration développée par l'ADN en présence de phloroglucinol n'est significative que pour des concentrations en ADN-P supérieures à 30 microgrammes : de 30 à 100 microgrammes (limite supérieure des concentrations étudiées) la coloration est directement proportionnelle à la concentration (tableau XI, page 85, figure 14, page 86).

- TABLEAU XI -

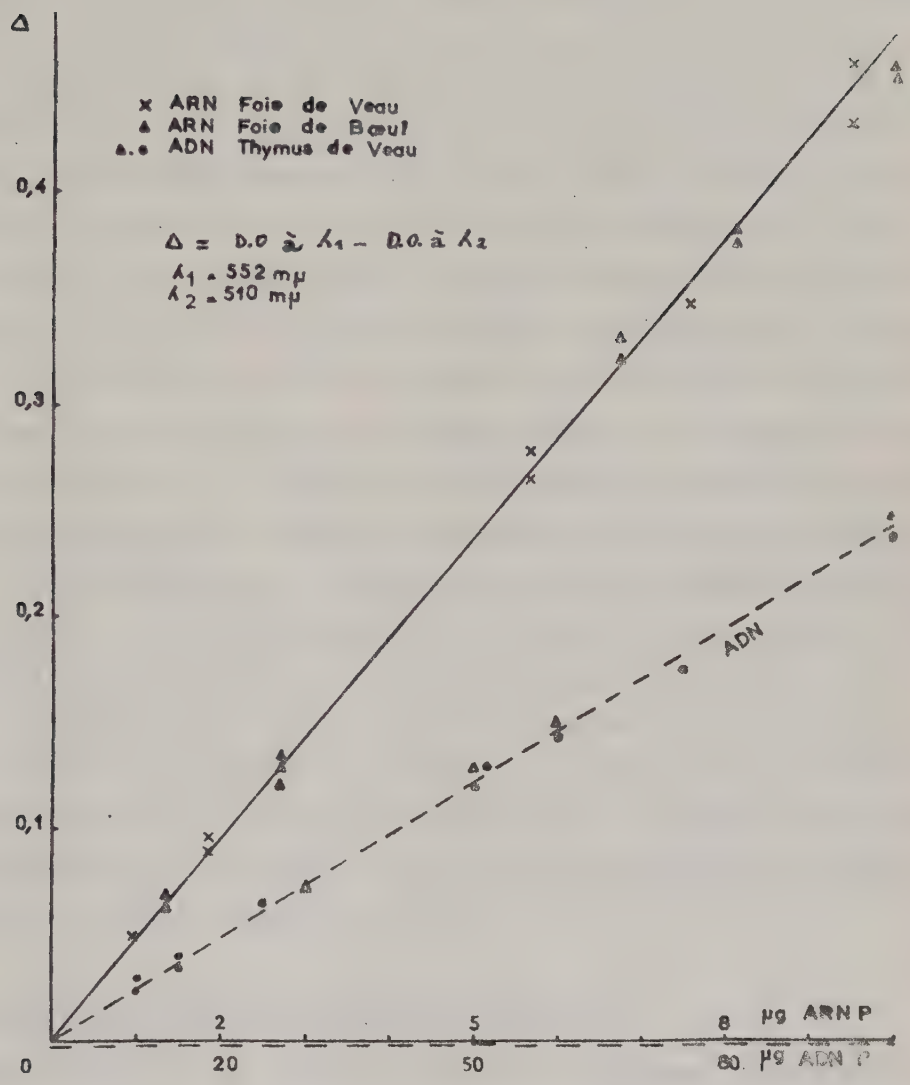
DOSAGE DE L'ARN PAR LA REACTION AU PHLOROGLUCINOL (Technique BOLOGNANI et Coll., 17)

COMPARAISON AVEC L'ADN DE THYMUS DE VEAU

Variations des densités optiques en fonction de la concentration

	MICROGRAMMES D'ARN-P														
	1			2			6			8			10		
Réf. ARN	552 µ	510 µ	Δ	552 µ	510 µ	Δ	552 µ	510 µ	Δ	552 µ	510 µ	Δ	552 µ	510 µ	Δ
INRA	0,065	0,015	0,050	0,115	0,020	0,095	0,380	0,090	0,290	0,485	0,115	0,370	0,650	0,170	0,490
	0,065	0,015	0,050	0,135	0,035	0,100	0,370	0,090	0,280	0,455	0,105	0,350	0,610	0,150	0,460
F 7	0,055	0,010	0,045	0,125	0,030	0,095	0,385	0,095	0,290	0,520	0,140	0,380	0,610	0,150	0,460
	0,055	-	0,055	0,120	0,030	0,090	0,340	0,090	0,250	0,515	0,130	0,385	0,600	0,130	0,470
	0,070	0,020	0,050	0,135	0,035	0,100	0,400	0,100	0,300	0,515	0,135	0,380	0,600	0,140	0,460

	MICROGRAMMES D'ADN-P														
	10 à 30			30			50			60			100		
Réf. ADN	552 µ	510 µ	Δ	552 µ	510 µ	Δ	552 µ	510 µ	Δ	552 µ	510 µ	Δ	552 µ	510 µ	Δ
V 74	Densités Optiques						0,185	0,055	0,130	0,210	0,065	0,145	0,360	0,110	0,250
	difficilement interprétables			0,110	0,035	0,075	0,135	0,015	0,120	0,200	0,050	0,150			
V61	coloration trop faible			0,095	0,030	0,065	0,190	0,070	0,120				0,340	0,100	0,240



Dosage de l'ARN par la reaction au phloroglucinol (Technique de Bolognani)
Comparaison à l'ADN

Figure 14

En comparant les résultats ainsi obtenus avec ceux fournis par l'ARN (1 à 10 microgrammes d'ARN-P) dans les mêmes conditions, il apparaît que l'interférence de l'ADN dans la détermination colorimétrique de l'ARN est de 5 p. cent (100 microgrammes d'ADN-P donnent la même coloration que 5 microgrammes d'ARN-P), aussi, étudierons-nous ultérieurement la possibilité d'un dosage direct de l'ARN dans l'ADN par cette technique. Cette interférence de l'ADN, qui était éliminée par lecture dichromatique à 552 et 510 millimicrons dans la réaction initiale de DISCHE-BORENFREUND (47) (IIème partie, Chap.II) est vraisemblablement due à la teneur plus importante du milieu réactionnel en acide chlorhydrique concentré qui, si elle double approximativement la sensibilité de cette réaction vis à vis de l'ARN, entraîne néanmoins une réponse de l'ADN consécutive à la transformation partielle du désoxyribose en dérivés furfuryliques.

La perturbation entraînée par cette augmentation de l'acidité est telle que l'analyse spectrale de la réaction colorée ADN-phloroglucinol permet de construire une courbe dont le tracé est comparable à celle que fournit l'ARN avec ce même chromogène(figure 9, page 51). Les maxima d'absorption étant situés dans les deux cas à 552 millimicrons, il devient inutile de retrancher des D.O. lues à 552 millimicrons, les D.O. lues à 510 millimicrons : par lecture unique au maximum d'absorption (552 millimicrons) (voir tableau XI, P. 85) la réaction devient pour l'ARN aussi sensible que la réaction à l'orcinol tandis que l'interférence de l'ADN reste du même ordre (5 p.cent). Nous avons, cependant, gardé ce mode d'expression des résultats qui garantit à cette méthode de dosage une meilleure reproductibilité.

III- ETUDE DE LA REACTION COLOREE ENTRE L'ADN ET L'ORCINOL -

Les échantillons d'ADN, ayant subi le même traitement préliminaire que précédemment pour éviter la participation d'impuretés ribonucléiques dans cette réaction de l'ADN avec l'orcinol, sont soumis aux mêmes protocoles expérimentaux que l'ARN (macro et micro-méthode, IIème partie, chap.3). Cette étude sera complétée par l'utilisation de la technique de CERIOTTI (29) dans laquelle l'extraction du pigment coloré par l'alcool isoamylique doit, semble-t-il, diminuer la coloration fournie par l'ADN.

Résultats :

Après un chauffage de 20 minutes à 100° C ou 30 minutes à 80° C, selon que l'on opère en macro ou en microméthode, l'ADN donne avec l'orcinol chlorhydrique une coloration verte dont le maximum d'absorption se situe comme pour l'ARN à 665 millimicrons (figure 15.).

Cette coloration est, semble-t-il, uniquement due à l'ADN dont le précipité obtenu en milieu acide peut être considéré comme débarrassé de toute trace d'ARN. Les faits expérimentaux qui permettent une telle affirmation seront rapportés ultérieurement (page 111).

1°) Technique de MOULE.

La coloration fournie par l'ADN, en macrométhode, est faible mais reproductible quelle que soit l'origine et le mode de préparation de cet ADN (figures 10 et 16, pages 57 et 90).

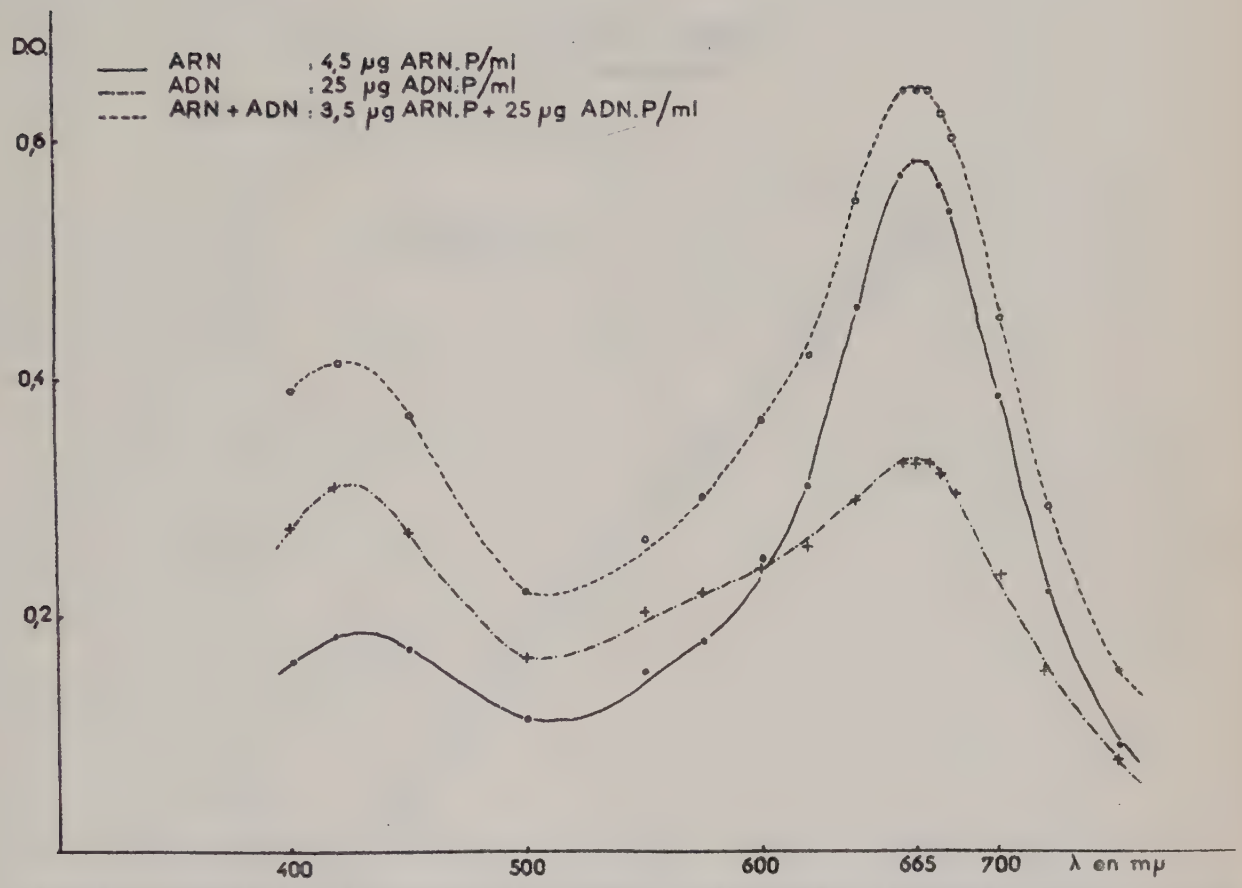
Pour des concentrations en ADN comprises entre 10 et 40 microgrammes d'ADN-P, les colorations obtenues sont identiques à celles fournies par des quantités 10 fois plus faibles d'ARN-P (figure 10) ; dans ces limites de concentration, l'ADN interfère donc à 10 p.cent dans la détermination colorimétrique de l'ARN.

Au delà de 40 microgrammes d'ADN-P, la coloration n'est plus directement proportionnelle à la concentration (figure 16). Dans ce cas, la solution s'accompagne d'un très léger trouble qui augmente avec la concentration. Du fait de la diminution toute relative des D.O., l'interférence de l'ADN tend à diminuer ; mais ceci ne présente que très peu d'intérêt puisque la réaction n'est pratiquement plus utilisable au delà de 60 microgrammes d'ADN-P.

2°) Technique de CERIOTTI.

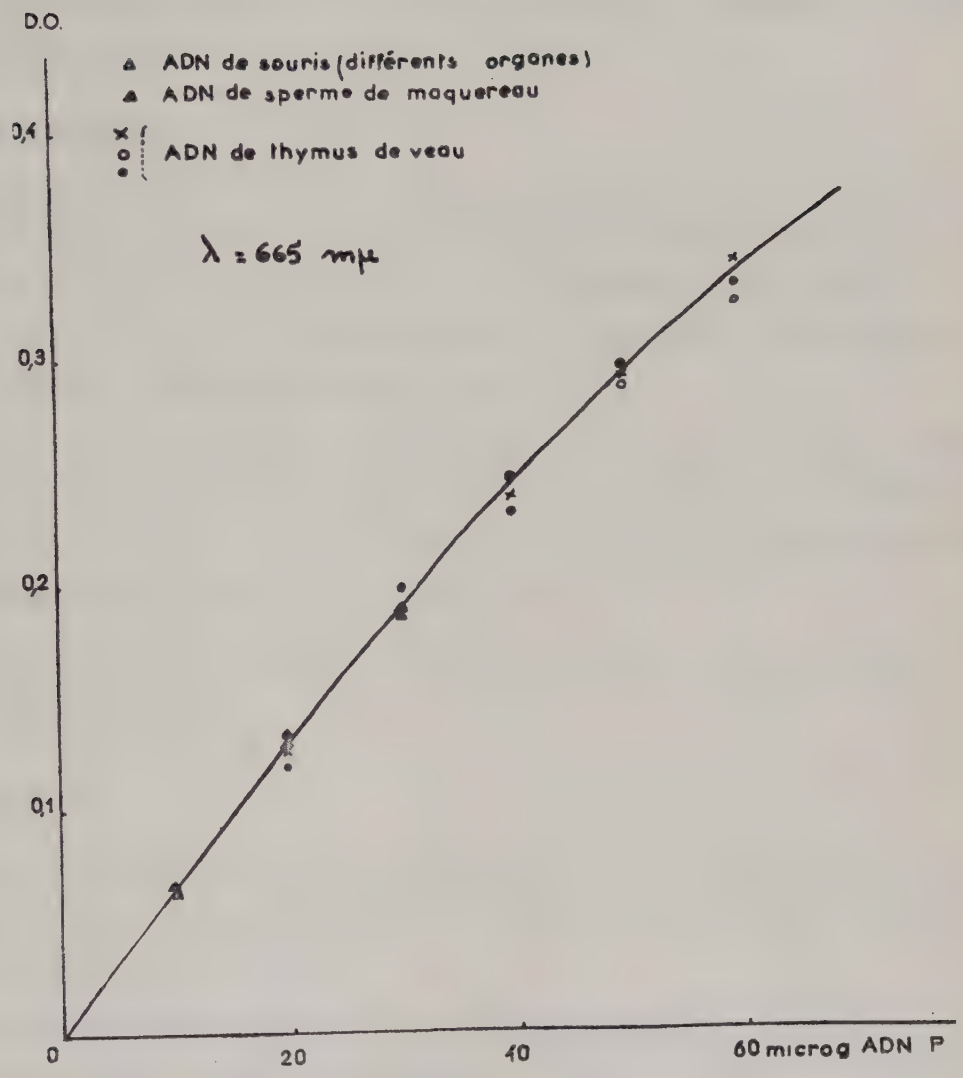
Cette réaction à l'orcinol obéit au même principe que la réaction précédente mais nécessite pour sa réalisation un temps de chauffage plus long suivi, après refroidissement, de l'extraction du pigment coloré par l'alcool isoamylique avec comme conséquence une augmentation de la sensibilité par concentration du pigment.

Après séparation, les D.O. de la couche alcoolique sont lues à 665 millimicrons.



ETUDES SPECTRALES DES REACTIONS COLOREES DES ACIDES NUCLEIQUES AVEC L'ORCINOL

Figure 15



REACTION DE L'ADN AVEC L'ORCINOL CHLORHYDRIQUE

Figure 16

a) Réactifs :

Les réactifs sont en tout point identiques aux réactifs précédemment utilisés (IIème partie, chap. III, p. 56) ; il y a lieu, cependant, d'y ajouter l'alcool isoamylique R.P.

b) Mode opératoire :

Verser dans un tube de 30 ml bouchant à l'émeri, 2 ml de la solution perchlorique d'ADN (ADN V 97), résultant du traitement préliminaire de cet échantillon (chapitre 6) et contenant de 10 à 100 microgrammes d'ADN-P puis 2 ml de réactif à l'orcinol (R.5). Les tubes bouchés sont maintenus 40 minutes au bain marie bouillant puis refroidis sous eau froide.

Ajouter dans chaque tube 2 ml d'alcool isoamylique R.P.. Agiter fortement, laisser décanter, prélever le surnageant alcoolique qui renferme le pigment coloré et lire la coloration à 665 millimicrons dans une cuve de 10 mm de traversée contre un témoin réactif traité de la même façon.

Faire simultanément une gamme avec de l'ARN (1 à 10 microgrammes d'ARN-P) et comparer les résultats.

c) Résultats.

Après extraction par l'alcool isoamylique, la coloration fournie par l'ADN est directement proportionnelle à la concentration pour les valeurs inférieures à 20 microgrammes d'ADN-P (fig. 17).

L'interférence de l'ADN qui est de 10 p.cent en deçà de cette limite (20 microgrammes d'ADN-P donnent pratiquement la même coloration que 2 microgrammes d'ARN-P) décroît au fur et à mesure que l'on augmente la concentration en ADN-P : ainsi à 60 et à 80 microgrammes d'ADN-P ne correspondent plus qu'une interférence de 7 et de 6,2 p. cent. L'allure de la courbe obtenue (figure 17) laisse prévoir qu'au delà de 100 microgrammes d'ADN-P, la coloration fournie par l'ADN sera pratiquement constante si bien que l'interférence de l'ADN diminuera rapidement au point de pouvoir confirmer, peut être, les résultats de CERIOTTI (29) qui partant de 10 milligrammes d'ADN conclut à une interférence de l'ADN de 0,85 p. cent.

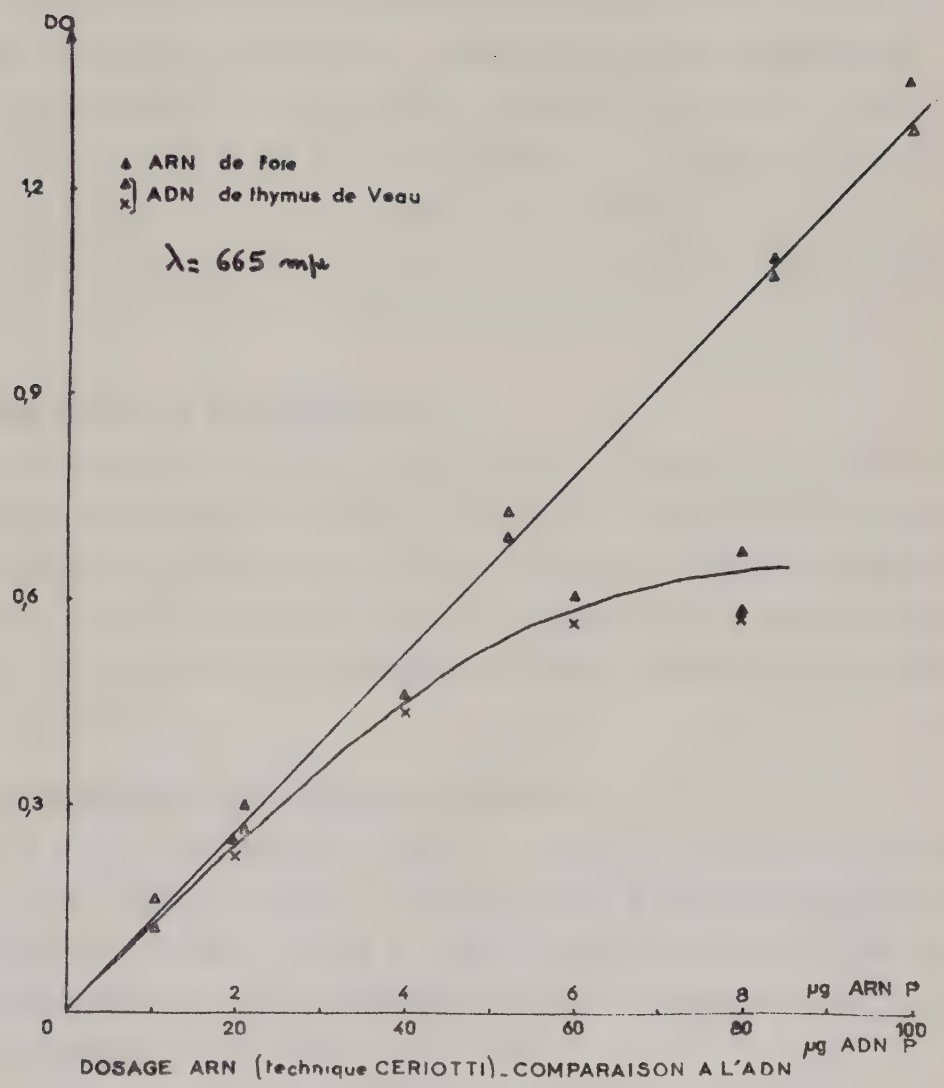

DO
1,2
0,9
0,6
0,3
0
▲ ARN de foie
× ADN de thymus de Veau
λ= 665 mμ
2
4
6
8
µg ARN P
20
40
60
80
100
µg ADN P
DOSAGE ARN (technique CERIOTTI)_COMPARAISON A L'ADN

Figure 17

Ces données ne recoupent pas nos faits expérimentaux, mais il ne nous a pas semblé utile d'établir les raisons de cette discordance pour une technique qui, nécessitant l'extraction alcoolique du pigment coloré, ne présente, par ailleurs, aucun avantage sur la méthode précédente.

3°) Microméthode.

Cette étude a été faite avec l'ADN V_{97} selon la technique précédemment décrite dans la IIème partie, chapitre 3. Nous avons obtenu les résultats suivants :

la réponse de l'ADN en microméthode, n'est pas linéaire et décroît en fonction de la concentration et du temps de chauffage (figure 18) : ainsi, après un chauffage de 30 minutes à 80° C l'interférence de l'ADN passe de 10 p.cent pour 10 microgrammes d'ADN-P à 9,5 p. cent pour 50 microgrammes et à 8 p. cent pour 80 microgrammes ; tandis qu'au bout de 60 minutes pour ces mêmes concentrations, les interférences de l'ADN ne sont plus respectivement que de 6,2, et 5,3 p. cent.

IV- ETUDE DU DOSAGE DIRECT DE L'ARN DANS L'ADN -

Le principe même du dosage direct de l'ARN dans l'ADN, qui consiste à déterminer la quantité d'ARN présent d'après la coloration fournie par cet ensemble après en avoir déduit la part due à l'ADN, laisse supposer que les deux AN en présence l'un de l'autre réagissent comme s'ils étaient seuls. Nous avons tenu à nous en assurer en entreprenant le dosage de mélanges d'AN par les techniques de MOULE et de BOLOGNANI.

1°) Réaction d'un mélange ARN + ADN avec l'orcinol.

La réaction à l'orcinol effectuée selon la technique de MOULE ne permettant pas d'opérer sur des prises d'essai d'ADN supérieures à 50 microgrammes d'ADN-P puisqu'il se forme un trouble au delà de cette concentration, nous avons ajouté à ces 50 microgrammes des quantités croissantes d'ARN-P constituant ainsi différents mélanges d'AN contenant de 2 à 20 p. cent d'ARN.

a) Mode opératoire

Après un dosage du désoxyribose par la réaction de BURTON (IIème partie, chapitre V), la solution perchlorique d'ADN, résultant du traitement préliminaire de cet échantillon selon le procédé mentionné au début de ce chapitre, est amenée à la concentration de 50 microgrammes d'ADN-P/ml.

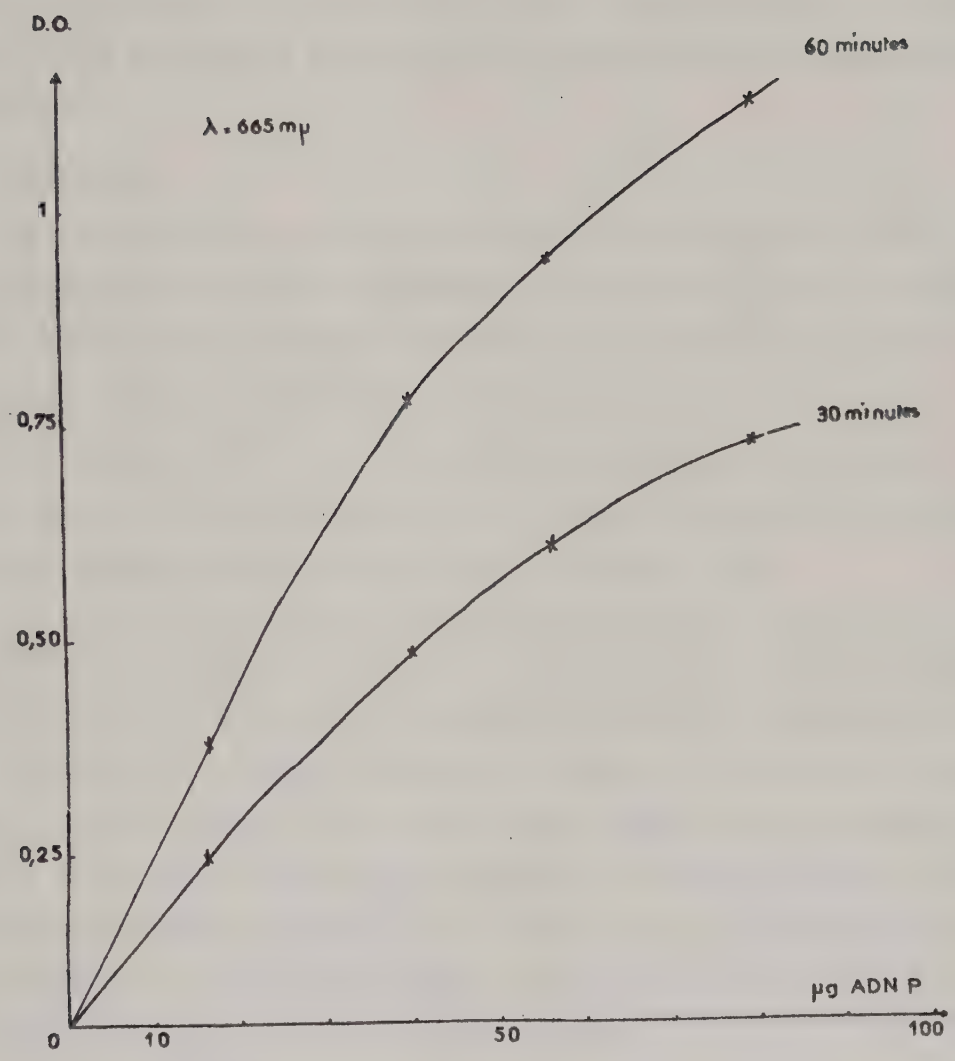


Figure 18

REACTION DE L'ADN AVEC ORCINOL à 80°C (microméthode)

Influence du temps de chauffage

Cette solution est répartie dans 7 tubes de 30 ml bouchant à l'émeri à raison d'un ml par tube auquel on ajoute respectivement pour les six premiers tubes 1, 2, 4, 6, 8 et 10 microgrammes d'ARN-P, le dernier tube constituant le témoin ADN ne reçoit aucune surcharge d'ARN. Les différents volumes sont amenés à 2 ml par ClO_4H 0,5 N et chaque tube, après avoir reçu 2 ml de réactif à l'orcinol (R.5) est maintenu 20 minutes au bain marie bouillant. Après refroidissement, les colorations sont lues à 665 millimicrons contre un témoin obtenu dans les mêmes conditions.

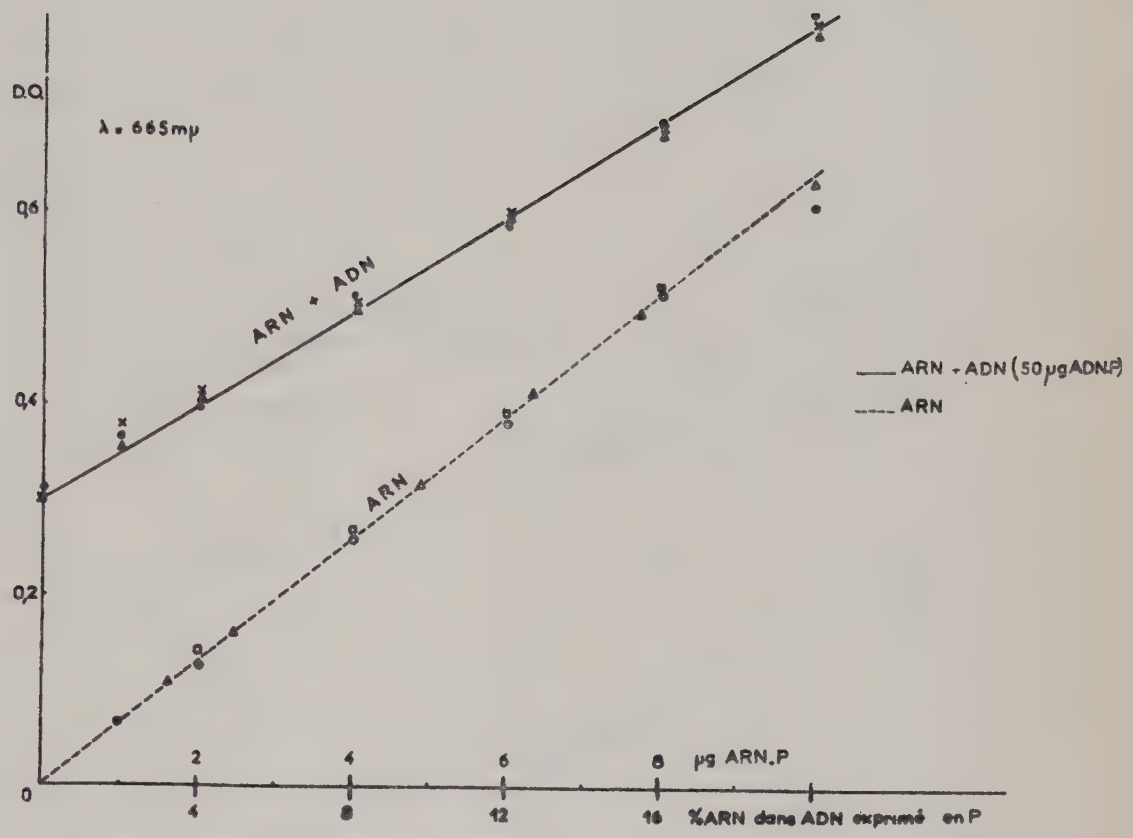
b) Résultats

La courbe tracée en portant en abscisse les surcharges d'ARN-P et en ordonnée les densités optiques correspondantes (tableau XII) est une droite non parallèle à celle qui correspond au dosage de l'ARN seul(fig. 19, page 96). On constate une inhibition progressive de la coloration au fur et à mesure que la concentration en ARN augmente : plus il y a d'ARN en réaction, plus la densité optique est inférieure à la somme des densités optiques correspondant à la prise d'essai d'ADN et à la surcharge d'ARN, ce qui tend à diminuer la sensibilité d'une telle technique de dosage direct de l'ARN dans l'ADN.

Ces résultats ne nous permettent pas de préciser lequel de ces deux AN se comporte comme un inhibiteur vis à vis de la réaction colorée développée par l'autre. L'expérience inverse qui consiste à doser des quantités constantes d'ARN en présence de quantités croissantes d'ADN nous a fourni des résultats comparables (fig. 20, page 97). On a donc à faire, dans le cas du dosage d'un mélange d'AN, à une réaction compétitive où chaque AN, capable de réagir avec l'orcinol, bloque une partie du réactif et ne laisse pas à l'autre la possibilité de réagir pleinement ; ceci laisse supposer que cette inhibition serait nulle si l'interférence de l'ADN était plus faible ou si la concentration du réactif en orcinol était plus grande.

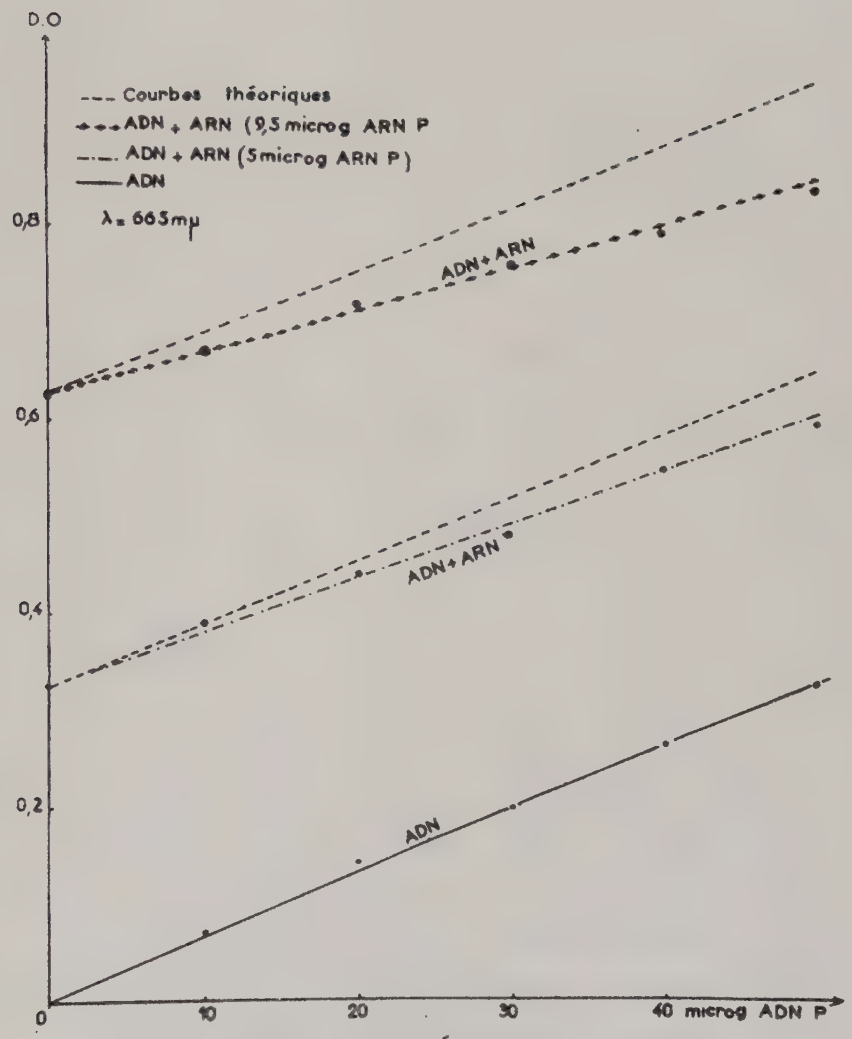
2°) Réaction d'un mélange ARN - ADN avec le phloroglucinol .

Pensant que la réponse du système ARN-ADN serait différente avec une réaction où l'interférence de l'ADN est moins grande, nous avons étudié le comportement de mélanges identiques d'ARN et d'ADN avec le phloroglucinol (technique de BOLOGNANI et coll. (page 83).



ETUDE COMPARATIVE DES REACTIONS COLOREES FOURNIES PAR L'ARN ET PAR L'ARN SURCHARGÉ EN ADN AVEC L'ORCINOL

Figure 19



ETUDE COMPARATIVE DES RÉACTIONS A L'ORCINOL FOURNIES PAR L'ADN ET L'ADN SURCHARGÉ EN ARN

Figure 20

- TABLEAU XII -

DENSITES OPTIQUES OBTENUES à 665 millimicrons
AVEC DIFFERENTS ADN SURCHARGES AVEC LE MEME ARN

ADN 50 microg. ADN-P	Surcharges en microgrammes d' ARN-P						
Références	0	1	2	4	6	8	10
V 76	0,295	0,345	0,395	0,495	0,570	0,700	
V 76	0,300	0,375	0,415	0,495	0,610	0,690	
V 76	0,300	0,365	0,405	0,500	0,610	0,685	
V 76	0,290	0,340	0,395	0,500	0,600	0,690	0,795
V 76	0,315	0,365	0,420	0,530	0,620	0,690	0,800
V 77	0,310	0,380	0,420	0,510	0,610	0,685	0,800
V 77	0,295	0,380	0,415	0,505	0,600	0,705	0,820
V 80	0,305	0,365	0,405	0,510	0,585	0,680	0,825
V 80	0,320		0,400	0,520	0,610	0,715	0,815

a) Mode opératoire

Les mélanges d'ARN et d'ADN sont effectués, comme précédemment, mais dans des tubes à hémolyse et avec des volumes beaucoup plus faibles ; ainsi, les 50 microgrammes d'ADN-P occupent un volume de 0,2 ml tandis que les différentes surcharges d'ARN ne doivent pas dépasser 0,3 ml. Les différents volumes sont ajustés à 0,5 ml, s'il y a lieu, avec ClO_4H 0,5 N puis tous ces tubes, après avoir reçu 0,5 ml de ClH concentré (R.1) et 4,5 ml du réactif au phloroglucinol (R.5), sont maintenus 5 minutes au bain marie bouillant. Après refroidissement, ces tubes sont placés dans la glace jusqu'à lecture des colorations à 552 et à 510 millimicrons contre un témoin réactif obtenu dans les mêmes conditions. La différence entre les valeurs obtenues à ces deux longueurs d'ondes correspond à la densité optique du mélange ARN-ADN.

b) Résultats

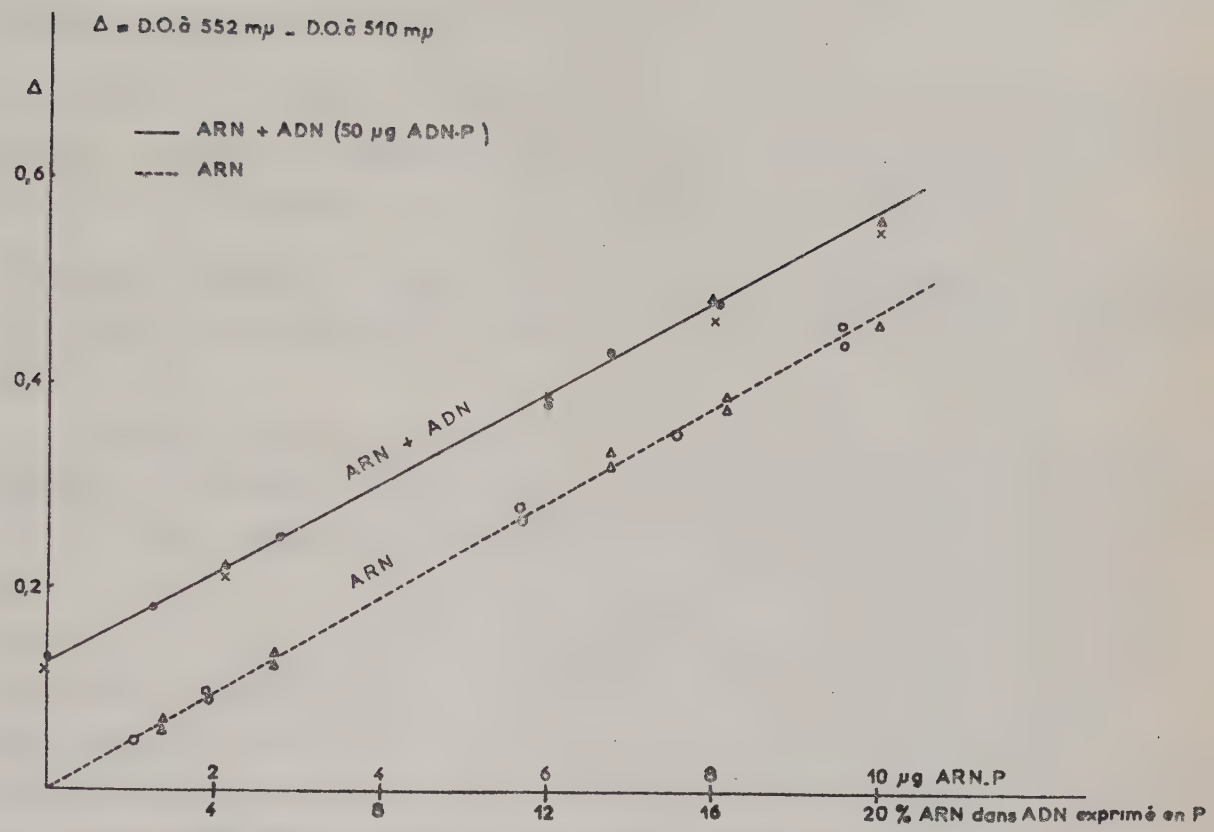
Il y a, dans ce cas, une correspondance parfaite entre les résultats obtenus et les valeurs théoriques pour lesquelles la D.O. du mélange est égale à la somme des D.O. correspondant à la prise d'essai d'ADN et à la surcharge d'ARN (comparer les tableaux XI et XIII). Dans ces conditions, la droite, tracée en portant en abscisse les surcharges d'ARN (1 à 10 microgrammes d'ARN-P) et en ordonnée les D.O. correspondantes est pratiquement parallèle à celle obtenue lors du dosage de l'ARN seul (fig. 21, page 101).

Ces résultats, en opposition à ceux obtenus lors du dosage de mélanges identiques d'AN par la réaction à l'orcinol, semblent devoir s'expliquer par la faible participation de l'ADN dans cette réaction au phloroglucinol. L'interférence de l'ADN n'y étant que de 5 p. cent (IIIème partie, page 83), on conçoit aisément que la quantité de réactif fixé par l'ADN, ou plus exactement par les dérivés furfuryliques provenant de l'hydrolyse acide du désoxyribose, soit inférieure à celle fixée au cours de la réaction à l'orcinol. Ces deux substances chromogéniques, phloroglucinol et orcinol, étant en quantité très voisine dans le milieu réactionnel (9,45 mg de phloroglucinol contre 10 mg d'orcinol), il y aurait, dans le cas de la réaction au phloroglucinol, un excès de réactif par rapport aux substances réagissantes ; cette parfaite correspondance qui existe entre le dosage des AN seuls et le dosage de mélange d'AN serait ainsi expliqué, dans les limites étudiées.

- TABLEAU XIII -

DENSITES OPTIQUES OBTENUES LORS DU DOSAGE DES DIFFERENTS ADN SURCHARGES EN ARN PAR LA REACTION AU PHLOROGLUCINOL

Surcharges en microg. ARN. P.	ADN 50 microg. ADN. P.	Longueur d'onde (en millimicrons)		
		552	510	552 - 510
0	V 74	0,135	0,015	0,120
		0,110	0	0,110
	V 61	0,185	0,055	0,130
1	V 74	0,190	0,020	0,170
		0,205	0,035	0,170
	V 61	0,240	0,070	0,170
2	V 74	0,245	0,035	0,210
		0,270	0,050	0,220
	V 61	0,330	0,090	0,240
6	V 74	0,535	0,145	0,390
		0,515	0,120	0,395
	V 61	0,530	0,130	0,400
8	V 74	0,610	0,150	0,460
		0,650	0,160	0,490
	V 61	0,630	0,150	0,480
10	V 74	0,775	0,200	0,575
		0,745	0,195	0,550



ETUDE COMPARATIVE DES REACTIONS COLOREES FOURNIES PAR L'ARN ET PAR L'ARN SURCHARGÉ EN ADN AVEC LE PHLOROGLUCINOL

Figure 21

V - MISE EN OEUVRE DU DOSAGE DIRECT DE L'ARN DANS L'ADN -

L'ADN en fibres (2 à 4 mg) est hydrolysé par 2 ml de ClO_4H 0,5 N à 70° C pendant 20 minutes ; sur l'hydrolysat on effectue :

1°) La réaction de BURTON à la diphénylamine (IIe partie) pour évaluer indirectement la teneur en phosphore désoxyribonucléique (ADN-P) (prise d'essai de 0,5 ml à 1 ml d'une dilution au 1/20 faite à partir de 1 ml d'hydrolysat).

2°) Soit la réaction à l'orcinol, soit la réaction au phloroglucinol sur une prise d'essai de 50 microgrammes d'ADN-P selon les techniques opératoires précédemment décrites.

Des D.O. obtenues, on déduit directement le pourcentage d'ARN dans l'ADN (exprimé en phosphore) en se reportant aux courbes étalons (fig.19 et 20, pages 96 et 97) qui résultent de nos expériences de surcharge de l'ADN par l'ARN.

Les pentes de ces courbes étant faibles, il est difficile de déterminer avec une grande précision des contaminations de l'ADN par l'ARN qui soient inférieures à 4 p. cent ; ce côté limitatif de ces deux techniques ne saurait néanmoins leur assurer une très grande précision au delà de 4 p. cent et les résultats obtenus ne sont que l'indication d'un ordre de grandeur de la contamination de l'ADN étudié.

En conclusion, le dosage direct de l'ARN dans l'ADN par la réaction à l'orcinol ou au phloroglucinol, s'il est d'exécution simple, ne permet pas de déterminer de très faibles contaminations de l'ADN par l'ARN.

- CHAPITRE II -

DOSAGE DE L'ARN DANS L' ADN APRES SEPARATION DES DEUX ACIDES NUCLEIQUES

Le peu de sensibilité que confère l'interférence de l'ADN au dosage direct de l'ARN dans l'ADN nécessite d'opérer ce qu'il est convenu d'appeler en toxicologie "l'enrichissement préalable".

Cette opération, largement utilisée par TRUHAUT et coll. (59, 165)dans le cas des dosages colorimétriques des métaux toxiques, consiste à isoler un microconstituant existant à l'état de traces dans un ensemble d'autres macroconstituants. Cette séparation, qui doit être intégrale, permet d'isoler cet élément à l'état pur et assure ainsi la spécificité de son dosage.

Dans le cas du dosage de l'ARN dans l'ADN, on conçoit sans peine l'intérêt d'un tel enrichissement pour permettre le développement de la réaction colorée uniquement à partir de l'ARN. Une telle pratique permettrait, en outre, d'augmenter la sensibilité du dosage puisqu'elle constitue une véritable concentration de l'élément à doser.

Les procédés d'enrichissement, utilisables pour la séparation des AN, sont très différents les uns des autres ; aussi, devrons-nous, avant d'aborder le problème qui nous préoccupe, choisir une méthode de séparation convenable.

A - CHOIX D'UNE METHODE D'ENRICHISSEMENT -

Les méthodes de séparation sont nombreuses mais toutes font l'objet de sérieuses critiques : ou la séparation est incomplète et l'ADN reste faiblement contaminé, ou la séparation est effective mais, alors, les AN obtenus ne répondent plus à leur structure de polymères. Ceci est surtout valable pour l'ARN dont la structure ne lui assure pas une grande stabilité moléculaire ; mais cet inconvénient ne subsiste plus si l'on considère le problème uniquement du point de vue analytique.

1°) Méthodes de séparation assurant l'intégrité des molécules d'AN

Ces méthodes nombreuses et variées sont rarement quantitatives. Elles reposent, soit sur la différence de mobilité électrophorétique des molécules d'AN, soit sur la solubilité différentielle des sels de Ca des AN ou des complexes AN-Cetavlon , ou sur la précipitation différentielle des AN par le chlorure d'Indium ($InCl_3$). Cette séparation peut également s'effectuer par adsorption de l'ARN sur charbon activé. Une technique toute récente de centrifugation en gradient de densité, permet également l'extraction et la séparation des AN à partir de cellules homogénéisées dans le chlorure de césium.

- La séparation par électrophorèse est une méthode douce mais laborieuse (181).

- L'utilisation des sels de Ca (30) provoque la précipitation de l'ARN, mais cette séparation est loin d'être complète et nécessite l'action complémentaire de la RNase.

- Les AN forment avec le Cetavlon* (bromure de cétyl-triméthylammonium) des complexes dont la solubilité dans ClNa est fonction de la concentration en sel ; ainsi, soluble à 0° C dans ClNa concentré, le complexe ADN-Cetavlon précipite généralement pour une concentration saline de 0,5 M, tandis que la précipitation du complexe de l'ARN ne commence qu'en milieu ClNa 0,3 M. Mais, la précipitation de l'ADN pouvant s'accompagner, selon l'origine des AN, d'un début de précipitation de l'ARN (52), cette légère différence de solubilité de tels complexes ne permet pas une séparation complète des AN que l'on obtient dans des états relativement peu dégradés.

- ALDRIDGE (2) a décrit récemment une méthode permettant la précipitation différentielle des AN en solution dans ClNa 4 M par le chlorure d'Indium. Dans ces conditions, l'ARN précipite. L'ADN restant en solution peut, après dialyse, être précipité par le chlorure d'Indium.

- ZAMENHOF et CHARGAFF (180) utilisent pour séparer l'ARN de l'ADN, l'adsor. préférentielle de l'ARN sur charbon activé. Ce procédé est très efficace si la préparation a été complètement débarrassée de protéines et si seul l'ADN est hautement polymérisé (l'adsorption de l'ARN est fonction de son faible état de polymérisation). Après adsorption, les oligonucléotides sont élués par le phénol aqueux.

- TRAVAGLINI et MELONI (164) ont proposé, tout récemment, une technique qui permet de précipiter, après sélection d'un gradient de densité approprié, les AN, les N-P et les polysaccharides de cellules broyées dans le chlorure de césium saturé, tandis que les protéines et les lipoprotéines surnagent. La remise en suspension de ce précipité dans un nouveau gradient permet d'effectuer un second fractionnement qui aboutit à la séparation des deux AN. Cette méthode a le net avantage de permettre l'extraction d'AN hautement polymérisé à partir de petites quantités de tissus, mais elle nécessite l'emploi d'un matériel spécialisé.

2°) Méthodes de séparation entraînant la dégradation des molécules d'AN.

La purification de l'ADN peut être entreprise soit par traitement à la RNase (enzymes hydrolysantes spécifiques de l'ARN), soit par l'hydrolyse alcaline : l'ARN donne ainsi des mononucléotides acido-solubles et l'ADN des polynucléotides précipitables par l'acide perchlorique (séparation selon le procédé de SCHMIDT-THANNHAUSER) (141).

- La purification de l'ADN par la RNase est simple mais elle possède de nombreux inconvénients, le plus sérieux étant la dégradation incomplète de l'ARN en fragments diffusibles (111) : il se forme lors de l'hydrolyse enzymatique de l'ARN ce que les Anglo-Saxons appellent un "core" et qui constitue, en fait, une fraction ribonucléique résistante à l'action de la RNase (30) (114).

- Le comportement différent de l'ARN et de l'ADN en milieu alcalin permet leur séparation : c'est ainsi que l'ADN est précipité par acidification de l'hydrolysat tandis que l'ARN hydrolysé en substances plus simples reste soluble.

Il est généralement admis que les produits d'hydrolyse alcaline de l'ARN sont des mononucléotides ; en fait, cette dégradation est moins complète et la présence dans l'ARN d'une fraction résistante à l'hydrolyse alcaline est bien authentifiée : de nombreux auteurs dont POTTER (134), LANE (104) et FINAMORE (60) signalent la présence d'oligonucléotides (3 à 5 p. cent) dans des hydrolysats d'ARN consécutifs à l'action de l'alcali durant 18 heures à 37 ° C ; cette fraction constituée de purines dinucléotides serait due à la présence d'un sucre autre que le d-ribose qui empêcherait la formation du triester cyclique essentiel à la dégradation alcaline de l'ARN (fig.3, page 13) ; ce sucre a été identifié par SMITH (152) comme étant le 2' ou 3' orthométhylribose. Mais l'action prolongée de la soude se traduit par la formation presque exclusive des mononucléotides (32).

Après hydrolyse alcaline des AN, on peut éliminer les ribonucléotides par dialyse ; mais par cette technique il en reste toujours de 0,5 à 2 p.cent dans l'ADN (29) (172). Il est donc préférable de précipiter l'ADN de cet hydrolysat et de doser l'ARN directement sur le surnageant.

Nous avons retenu cette technique de séparation car, d'exécution simple, elle ne nécessite pas une grande quantité d'ADN et permet de déceler de faibles quantités d'ARN dans l'ADN.

B - DOSAGE DE L'ARN DANS L'ADN APRES HYDROLYSE ALCALINE DIFFERENTIELLE -

1°) Principe

Les différences de dégradation que subissent les AN en milieu alcalin confèrent à ce mode d'hydrolyse un caractère différentiel qui convient à la séparation quantitative de ces deux polymères : après digestion alcaline, l'ARN est, en effet, dégradé en nucléotides acido-solubles tandis que l'ADN, moins affecté par ce traitement n'est scindé qu'en oligonucléotides précipitables en milieu acide. Il suffira donc d'acidifier le liquide alcalin de digestion et de centrifuger pour recueillir, d'une part le précipité d'ADN, et, d'autre part, le surnageant ou fraction acido-soluble qui contient l'ARN dégradé (technique de SCHMIDT-THANNHAUSER).

Le dosage de l'ARN dans l'ADN nécessite alors, que soit effectuée sur chacune de ces phases l'une des réactions caractéristiques du composé qu'elle renferme. Ainsi, pratiquerons-nous sur la fraction acido-soluble la réaction à l'orcinol, tandis que la quantité d'ADN contenue dans le précipité perchlorique sera déterminée par la réaction de BURTON. Les résultats, en raison de notre système d'étalonnage (voir IIème partie, chap. 3 et 5) seront exprimés en phosphore nucléique ; nous déterminerons ainsi le pourcentage de phosphore ribonucléique contenu dans la prise d'essai d'ADN elle-même exprimée en phosphore désoxyribonucléique (pourcentage d'ARN-P dans l'ADN-P).

2°) Réactifs

Les réactifs sont ceux décrits lors de l'étude des réactions à l'orcinol et à la diphénylamine (IIème partie, chap. 3 et 5) ; il y a lieu d'y ajouter une solution de soude normale et une solution d'acide perchlorique 4 N.

3°) Mode opératoire

a) Séparation des deux AN

L'ADN en fibres (10 mg environ), maintenu 18 heures au bain marie à 37° C en présence de 2 ml de soude normale, est ensuite précipité par addition, à froid, de 1 ml d'acide perchlorique 4 N qui assure au milieu un titre final en acide perchlorique voisin de 0,6 N ; après centrifugation (10 min. à 10.000 t/min.), on recueille le surnageant qui contient l'ARN hydrolysé.

b) Dosage de l'ARN par la réaction à l'orcinol

Cette réaction peut s'effectuer, soit selon la technique de MOULE, soit selon la microméthode décrite dans la deuxième partie de ce travail.

1- Dosage par la technique de MOULE

A 1 ml de surnageant, on ajoute 1 ml d'acide perchlorique 0,5 N pour compléter à 2 ml le volume de la solution à doser, puis 2 ml du réactif à l'orcinol (R.5). L'ensemble est maintenu 20 minutes au bain marie bouillant ; après lecture de la D.O. à 665 millimicrons, on déduit de cette valeur la teneur en ARN-P d'1 ml de surnageant en se reportant à la courbe étalon (fig. 10, page 57) tracée à partir d'ARN de foie de veau de teneur en phosphore nucléique connue.

Remarque - Quand la contamination ribonucléique de l'ADN est faible, il est nécessaire d'effectuer ce dosage sur 2 ml de surnageant.

2- Dosage en microméthode

Les 3 ml de surnageant constituant la fraction acido-soluble sont préalablement neutralisés par addition de 0,75 ml de potasse 4 N : le perchlorate de K insoluble précipite, et après centrifugation (10 minutes à 10.000 t/min) le surnageant occupe un volume très voisin du volume initial.

Dans un tube de Kahn gradué de 0,5 à 2 ml, on introduit 2 ml de la solution précédente que l'on concentre sous vide jusqu'à réduction du volume initial à 0,5 ml.

Ce tube est placé dans un évaporateur rotatif Büchi constitué essentiellement d'un ballon de vitesse de rotation variable relié à sa partie supérieure à une pompe à vide. Pour éviter toute perte de liquide lors du dégazage de la solution, on fait un vide très progressif : la pression qui est de 5 mm de mercure au début de l'opération atteint au stade final 0,1 mm de mercure. Durant toute la durée de la concentration, environ 90 minutes, le ballon trempe dans un bain-marie à 40°C pour éviter la prise en masse de la solution.

Lorsque le volume de la solution n'est plus que de 0,5 ml, on ajoute 0,5 ml du réactif à l'orcinol et l'ensemble est, alors, maintenu 30 minutes au bain-marie à 80° C.

De la densité optique lue à 665 millimicrons en microcuve de 10 mm de traversée, on déduit par simple report à la courbe étalon (figure 11, page 59) la teneur en ARN-P de la solution testée dont le volume, par suite des manipulations précédentes, correspond à 2 ml du surnageant d'ARN. Nous déterminons donc de cette façon la quantité de phosphore ribonucléique présente dans 2 ml de la fraction acido-soluble.

c) Dosage de l'ADN par la réaction de BURTON.

Le précipité perchlorique d'ADN, lavé à froid par 2 ml d'acide perchlorique 4 N, est dissous dans 10 ml d'acide perchlorique 0,5 N après chauffage de 20 à 30 minutes à 70°C. Après dilution de cette solution au 1/20, on effectue sur 1 ml la réaction de BURTON telle qu'elle a été décrite dans la seconde partie (chapitre V).

En se reportant à la figure 13 (page 75), la densité optique obtenue à 600 millimicrons permet, compte tenu de la dilution, de déterminer la quantité de phosphore désoxyribonucléique (ADN-P) correspondant à la prise d'essai d'ADN.

d) Expression des résultats.

Les résultats des réactions colorées de l'ARN et de l'ADN étant exprimés en fonction de la teneur en phosphore (ARN-P ou ADN-P), nous avons calculé le pourcentage d'ARN-P dans l'ADN-P qui, compte tenu de la teneur en phosphore de chacun des AN, reste très voisin du pourcentage réel de l'ARN dans l'ADN.

Le pourcentage de phosphore ribonucléique présent dans le phosphore désoxyribonucléique est donné par la formule suivante :

$$\frac{V \times X \times 100}{P}$$

V étant le volume de l'hydrolysat d'ARN (3 ml)
X, la concentration en microg/ml de phosphore ribonucléique dans l'hydrolysat
et P, la quantité en microgrammes de phosphore désoxyribonucléique du précipité d'ADN.

Les pourcentages d'ARN dans l'ADN ainsi évalués à partir de différents ADN ont été rassemblés dans les tableaux XIV et XV, pages 109 et 110.

- TABLEAU XIV -

DOSAGE DE L'ARN DANS DIFFERENTS ADN APRES SEPARATION DES DEUX AN
(Technique de MOULE)

- - - - -

ADN Référence (*)	Teneur en ADN-P de la prise d'essai (Réaction de BURTON) P	ARN-P présent dans l'ADN (Réaction à l'Orcinol) V x X	Pourcentage d'ARN-P dans l'ADN-P $\frac{V \times X \times 100}{P}$
	en microgrammes		
V 27	790	22,7	2,87
V 27	660	20,3	3
V 3 (5)	650	10,2	1,56
V 7	665	15,2	2,28
V 74	675	4,55	0,82
V 77	692	5,9	0,85
V 77	682	5,95	0,87
V 80	698	3,69	0,52
V 82	682	4,2	0,61
V 82	634	4,05	0,64
V 83	735	10,2	1,38
V 83	660	12,1	1,84
V 84	785	2,55	0,44
V 89	686	9	1,3
V 90	672	2,25	0,33
V 97	704	4,75	0,67
S 42	635	50,8	8
S 42	720	55	7,63
RF	700	8	1,14
RF	680	8,1	1,17

(*) Les méthodes de préparation et les caractéristiques analytiques de ces différents ADN sont consignées dans le tableau IV, page 33.

- TABLEAU XV -

DOSAGE DE L'ARN DANS DIFFERENTS ADN APRES SEPARATION DES DEUX AN

(Microméthode)

ADN Référence (*)	Teneur en ADN-P de la prise d'essai (Réaction de BURTON) P	ARN-P présent dans l'ADN (Réaction à l'orcinol) V x X	Pourcentage d'ARN-P dans l'ADN-P $\frac{V \times X \times 100}{P}$
	en microgrammes		
V 77	692	6,75	0,97
V 77	682	6,6	0,96
V 80	692	6,5	0,94
V 80	693	6,5	0,94
V 82	682	3,9	0,57
V 82	634	3,75	0,59
V 90	741	2,4	0,32
V 90	672	2,3	0,34
V 97	704	5,15	0,73
V 97	687	5,10	0,74

(*) Les méthodes de préparation et les caractéristiques analytiques de ces différents ADN sont consignés dans le tableau IV, page 33.

4°- Sensibilité du dosage.

Les résultats obtenus par l'une ou l'autre de ces techniques colorimétriques sont pratiquement identiques (Tableau XIV p. 109, et XV p. 110), mais la sensibilité du dosage est très différente suivant que la réaction à l'orcinol est effectuée en microméthode ou par la technique de MOULE.

Cette dernière technique permet, lorsqu'on utilise une dilution au demi de la fraction acido-soluble, de doser de 0,5 à 5 p. cent d'ARN dans l'ADN ; en opérant sur 2 ml de cette même fraction, on double la sensibilité de la réaction permettant ainsi d'évaluer des contaminations ribonucléiques de l'ADN allant de 0,25 à 2,5 p. cent. Dans le cas, assez rare, où la contamination de l'ADN est plus élevée (l'ADN convenablement préparé contient environ 1 p. cent d'ARN), il est nécessaire de procéder aux dilutions suivantes :

Dilution de l'hydrolysat d'ARN	Volume d'hydrolysat employé	Pourcentage correspondant d'ARN-P dans l'ADN-P
1	2 ml	0,25 à 2,5 p.100
1/2	1 ml	0,5 à 5 p.100
1/4	0,5 ml	1 à 10 p.100
1/10	0,2 ml	2,5 à 25 p.100
1/20	0,1 ml	5 à 50 p.100

Lorsqu'on effectue la réaction à l'orcinol en microméthode, la sensibilité du dosage est pratiquement doublée et peut, dans certaines conditions, être quadruplée : cette technique, dans les conditions normales d'utilisation, permet de doser de 0,15 à 1,5 p. 100 d'ARN dans l'ADN, mais en maintenant le chauffage à 80°C, la coloration développée par l'ARN double d'intensité (figure 13, p.75) et permet d'évaluer des quantités aussi minimes que 0,07 p. 100 d'ARN dans l'ADN.

5°- Spécificité du dosage.

Il est bien évident que les résultats préalablement mentionnés n'ont de valeur que dans la mesure où la séparation des deux AN est complète, ce qui laisse supposer que la précipitation totale de l'ADN ne s'accompagne pas d'une

rétention de l'ARN. Nous avons tenu à nous en assurer en effectuant, d'une part, la réaction à la diphénylamine, spécifique de l'ADN, sur le surnageant de l'ARN et, d'autre part, la réaction à l'orcinol sur le liquide de lavage du précipité d'ADN ; ce dernier procédé ne constituant pas une preuve suffisante de la pureté du précipité d'ADN, nous avons dû effectuer sur différents ADN des surcharges en ARN pour nous assurer de leur passage dans le surnageant acide.

a) Recherche de l'ADN dans la fraction acido-soluble.

Lors de la séparation des deux AN, les polynucléotides désoxyribonucléiques alcalino-solubles ont été précipités par 1 ml d'acide perchlorique 4 M pour permettre d'entreprendre directement la réaction à la diphénylamine sur 1 ml du surnageant dont le titre en acide perchlorique est voisin de 0,6 N.

Ces recherches effectuées systématiquement, lors de chaque dosage d'ARN dans l'ADN se sont montrées négatives pour des échantillons d'ADN convenablement préparés. Voici, à titre d'exemple, les densités optiques lues à 600 millimicrons et correspondant à différents ADN.

ADN	D. O. à 600 mμ	ADN-P total (en microgrammes)	D.O. à 665 mμ correspondant à l'interférence de l'ADN avec l'orcinol
V 82	0,015	néant	nulle
V 83	0,010	néant	nulle
V 27	0,020	néant	nulle
S 42	0,035	0,8	nulle
RF	0,053	1,2	nulle

La sensibilité de notre test ne nous permet pas de déceler moins de 0,1 p. cent d'ADN dans le surnageant d'ARN.

Il passe donc, généralement, moins de 0,1 p. cent d'ADN dans la fraction d'ARN ; il peut, cependant, subsister dans certains cas (ADN RF) des traces plus importantes mais, encore, trop minimes pour perturber la détermination colorimétrique de l'ARN.

b) Recherche de l'ARN dans le liquide de lavage du précipité d'ADN.

La centrifugation rapide à laquelle on soumet le précipité perchlorique d'ADN permet de recueillir par simple transvasement le surnageant d'ARN.

Pour s'assurer qu'il n'y a pas de rétention significative d'ARN par le précipité d'ADN, le culot de centrifugation est lavé à froid par 2 ml d'acide perchlorique 0,5 N puis recentrifugé ; la réaction à l'orcinol est alors effectuée sur le surnageant.

Les densités optiques à 665 millimicrons ne dépassant pas 0,020 ou 0,030 sont ininterprétables ; les traces d'ARN présent ne justifient donc pas le lavage du précipité d'ADN qui, de plus, entraînerait la diminution de la sensibilité du dosage du fait de la dilution du surnageant d'ARN. Nous n'avons ainsi pas tenu compte dans nos dosages de cet ARN retenu par l'ADN précipité, ce qui ne constitue qu'une erreur négligeable.

Il y a lieu de faire les mêmes remarques quant à la rétention de l'ARN hydrolysé par les cristaux de perchlorate de K au cours du dosage en microméthode. Il est, en effet, nécessaire d'éliminer de cette fraction acido-soluble l'excès d'acide perchlorique qui, après concentration, précipite par addition du réactif à l'orcinol : il se produit un recul d'ionisation de cet acide, dont les cristaux insolubles à chaud, gênent considérablement le développement de la coloration, qui, de verte, devient jaune en entraînant le passage du maximum d'absorption de 665 à 430 millimicrons.

La sensibilité de notre test nous permet, en fait, de déceler jusqu'à 0,15 p. 100 d'ARN dans le précipité d'ADN - soit 1 microgramme d'ARN-P pour 700 microg d'ADN-P - Nous avons tenu à contrôler la pureté du précipité d'ADN en effectuant des surcharges d'ARN dans des solutions d'ADN non purifiés, c'est-à-dire contenant des traces d'ARN (contamination naturelle). Nos résultats, reportés dans le tableau suivant, sont très satisfaisants : l'erreur de la méthode n'y apparaît que de l'ordre de ± 5 p. cent.

ADN Réf.	Pourcentage ARN dans ADN (contamination naturelle)	Pourcentage ARN ajouté	Pourcentage ARN trouvé
V 5	1,60	1,50	3,16
	-	3,06	4,45
	-	4,50	5,75
	-	6,05	7,30
V 7	2,27	1,15	3,22
	-	2,30	4,40
	-	3,40	5,25
V 80	0,50	0,90	1,39
	-	1,80	2,28
	-	2,70	3,06
	-	3,65	4,30
	-	4,50	4,75

Remarque -

Cette étude sur la spécificité du dosage serait incomplète si l'on ne faisait état du comportement de l'ARN, isolé après hydrolyse, vis-à-vis de la réaction à l'orcinol.

Des travaux de HUTCHISON et de MUNRO (89) sur le comportement d'ARN de foie en milieu alcalin, il ressort qu'après un traitement d'une heure à 37°C par la soude N ou 0,3 N, tout l'ARN du tissu devient acido-soluble ; la coloration développée en présence d'orcinol constitue alors, une mesure exacte de l'ARN présent. Il est apparu, par contre, qu'après une hydrolyse alcaline de 24 heures, l'augmentation de la coloration fournie par l'orcinol est d'environ 8 p. cent et correspondrait à l'apparition dans la fraction acido-soluble d'impuretés protéiniques capables de réagir avec l'orcinol.

Nous n'avons personnellement trouvé aucune différence significative dans les colorations fournies par un même ARN (ARN F_2A) mis en solution dans l'acide perchlorique 0,5 N ou soumis à une hydrolyse alcaline de 18 heures à

37° C (Tableau VI page 62). D'autre part, le matériel à analyser étant constitué d'ADN en fibres pratiquement exempt de protéines, on peut admettre qu'il n'y a aucune contamination de nature protéinique de la fraction acido-soluble et que, de ce fait, la coloration développée avec l'orcinol est uniquement due à l'ARN.

En conclusion, il apparaît que l'interférence de l'ADN dans la détermination colorimétrique de l'ARN limite sérieusement la possibilité de doser directement l'ARN dans l'ADN : ce procédé, bien qu'il ne se soit pas soldé par un échec, ne permet, en effet, d'évaluer que de fortes contaminations de l'ADN (4 à 20 p.100 d'ARN dans l'ADN) mais nécessite pour sa mise en oeuvre de faibles quantités d'ADN (2 à 1 mg d'ADN en fibres ou 50 microg d'ADN P lorsqu'on analyse un ADN en solution)

Dans le cas du dosage indirect dont le principe même nécessite d'opérer un enrichissement préalable c'est-à-dire la séparation des deux AN pour rendre les réactions colorées du ribose spécifiques de l'ARN, la sensibilité est sérieusement augmentée puisque cette séparation constitue une véritable concentration de l'élément à doser. Ainsi, en utilisant la même réaction colorée (réaction à l'orcinol, technique de MOULE) on parvient à doser jusqu'à 0,25 p. cent d'ARN dans l'ADN. Utilisée en microméthode, cette même réaction permet d'évaluer jusqu'à 0,07 p. cent d'impuretés ribonucléiques dans l'ADN.

Ainsi, ces deux méthodes de dosage diffèrent essentiellement par leur sensibilité qui conditionne leur propre limite d'utilisation.

L'examen des tableaux de résultats (XIV p. 109, et XV p. 110) nous amène, d'autre part, à conclure que l'ADN de thymus est généralement peu contaminé par l'ARN (1 p. cent en moyenne) tandis que l'ADN de mélanges d'organes peut contenir jusqu'à 8 p. cent d'ARN.

La contamination de l'ADN par l'ARN serait donc liée à son origine, c'est-à-dire fonction du rapport qui existe entre ces deux AN dans l'organe dont ils sont extraits.

- - - - -

C O N C L U S I O N

La présence des deux acides nucléiques au sein même de la cellule rend difficile leur extraction sélective : c'est ainsi que les préparations d'ADN de tissus animaux et de microorganismes contiennent toujours des traces d'ARN. Cette contamination gênante du point de vue analytique l'est également sur le plan biologique, quand on essaie d'établir dans différents systèmes le pouvoir infectieux ou transformant de l'ADN. Il est donc nécessaire de pouvoir doser l'ARN dans l'ADN, et c'est dans cette perspective que ce travail a été entrepris.

Pour mieux situer le problème, nous avons effectué, dans une première partie, un bref rappel de nos connaissances actuelles sur la structure, l'extraction et l'analyse des acides nucléiques.

Ces données essentiellement bibliographiques ont été complétées, dans une deuxième partie, par l'étude critique des différentes méthodes de dosage des acides nucléiques. Nous avons ainsi examiné, dans un premier temps, les techniques de dosage communes aux deux acides nucléiques et plus particulièrement les réactions colorées du pentose . De toutes les techniques de dosage du ribose et du désoxyribose rapportées dans cette seconde partie, nous avons retenu pour l'ARN les réactions à l'orcinol et au phloroglucinol, et pour l'ADN la réaction à la diphénylamine.

Malheureusement, les réactions classiques du ribose sont également fournies par le désoxyribose ; cette interférence soulève de nombreuses difficultés lorsqu'il s'agit de caractériser l'ARN en présence d'ADN. En effet, si l'on tient compte de l'interférence de l'ADN dans la détermination colorimétrique de l'ARN, le grand excès d'ADN en réaction limitera rapidement la sensibilité d'un tel dosage. De même, si l'on sépare quantitativement au préalable l'ARN de l'ADN, la faible quantité d'ARN rendra cette opération délicate.

Nous avons néanmoins exploré l'une et l'autre de ces possibilités et notre troisième partie rapporte l'ensemble de nos recherches expérimentales.

Nous avons dû étudier successivement, dans un premier chapitre consacré à la méthode directe, les réactions colorées que fournit l'ADN avec certains chromogènes, phloroglucinol et orcinol, normalement utilisés pour le dosage de l'ARN. Les colorations obtenues avec ces deux composés organiques limitent la prise d'essai d'ADN à 50 microgrammes de phosphore désoxyribonucléique et, de ce fait, réduisent sérieusement les possibilités de doser directement l'ARN dans l'ADN. Ce procédé, bien qu'il ne se soit pas soldé par un échec, ne permet en effet d'évaluer que de fortes contaminations de l'ADN (4 à 20 p. cent d'ARN dans l'ADN).

Le dosage indirect, dont le principe même nécessite d'opérer un enrichissement préalable, c'est-à-dire la séparation des deux acides nucléiques, nous a fourni de meilleurs résultats. Ainsi, en utilisant l'une des réactions précédentes (réaction à l'orcinol), on est parvenu à doser jusqu'à 0,25 p. cent d'ARN dans l'ADN. Dans des conditions bien particulières, notamment après concentration sous vide, la sensibilité de ce dosage est nettement accrue et permet de détecter dans l'ADN un taux d'impuretés ribonucléiques aussi minime que 0,07 p. cent.

L'erreur commise est de l'ordre de ± 5 p. cent ; elle se produit lors de l'isolement de l'ARN par acidification du liquide alcalin obtenu par digestion de l'échantillon d'ADN. Cette méthode de dosage indirect constitue donc une technique de choix dont l'intérêt essentiellement analytique s'étend par voie de conséquences au domaine de la biochimie et de la toxicologie.

En effet, depuis que certains acides nucléiques extraits de virus oncogènes se sont révélés infectieux, on tend à assimiler leur action à celle de nombreux autres toxiques cancérigènes. Cependant, cette toxicité, tout comme le rôle fondamental joué par les acides nucléiques dans la transmission du code génétique, tient à l'organisation de la molécule tout entière ; on peut introduire alors la notion de toxicologie moléculaire.

-:-

Vu :

Le Président
de la thèse,

R. TRUHAUT

Vu :

Le Doyen
de la Faculté de Pharmacie,

G. VALETTE

Vu et Permis d'Imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

J. ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

1- ALBAUM M.G., UMBREIT W.W. -
Differenciation between Ribose-3-Phosphate and Ribose-5-Phosphate by means of orcinol - pentose reaction.
J. Biol. Chem. 167/369/1947

2- ALDRIDGE W.G. -
A new Method for the Differential Precipitation of Nucleic Acids from Aqueous Solutions.
Nature 187/323/1960

3- ANDERSON A.S., BARKER G.R., GULLAND J.M. & LOCK M.V. -
The Constitution of Yeast ribonucleic acid Part XV - The mode of union of the nucleotides.
J. Chem. Soc. 1952/369

4- ASHWELL G. -
Colorimetric Analysis of Sugars
In "Methods in Enzymology" - Ed. by COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O.
Acad. Press New York 1957 - Vol. III - p. 73.

5- ATANASIU P., ORTH G., REBIERE J.P., BOIRON M. & PAOLETTI C. -
Production de tumeurs chez le Hamster par inoculation d'acide désoxyribonucléique extrait de cultures de tissus infectés par le virus du polyome.
C.R. Acad. Sci. 254/4228/1962.

6- AVERY O.T., Mac LEOD C.H. & Mc CARTY M. -
Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types - Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III.
J. Exp. Med. 79/137/1944.

7- BAILEY R.W. -
The Reaction of Pentoses with anthrone.
Biochem. J. 68/669/1958

8- BAKAY B., KIRSCHNER L. and TOENNIES G. -
The Determination of Nucleic Acids by their Reactions with Cysteine and Sulfuric Acid.
Arch. Biochem. Biophys. 65/500/1956.

9- BARKER G.R., FARRAR K.R. & GULLAND J.M. -
The Constitution of Yeast ribonucleic Acid. Part X - Further Studies on the nature of the carbohydrate radicals.
J. Chem. Soc. 1947/21.

10- BARON F. & BROWN D.M. -
The Structure of Cytidylic Acids a and b.
J. Chem. Soc. 1955/2855.

11- BARRENSCHEN H.K. & PEHAM A. -
Zür photometrischen Bestimmung der Nucleoside und Nucleotide auf Grund der Orcin Reaktion.
Z. Physiol. Chem. 272/81/1942.

12- BELJANSKI M. -
A propos du microdosage du ribose dans les acides nucléiques et leurs dérivés.
Ann. Inst. Pasteur 76/451/1949.

13- BERENBLUM I. & CHAIN E. -
Studies on the colorimetric determinations of phosphate.
Biochem. J. 32/286/1938.

14- BIAL M. -
Ueber die Diagnose der Pentosuric mit dem von mir angegebenen Reagens.
Deut. Med. Wochschr. 29/477/1903.

15- BODANSKY A. -
Phosphatase Studies. I- Determination of inorganic phosphate. Beer's law and interfering Substances in the Kuttner - Lichtenstein method.
J. Biol. Chem. 99/197/1932.

16- BOIRON M., PAOLETTI C., THOMAS M., REBIERE J.P. & BERNARD J. -
Acide désoxyribonucléique infectieux extrait de culture de cellules de reins de singe babouin infectées par le virus SV 40.
C.R. Acad. Sci. 254/2097/1962.

17- BOLOGNANI L., COPPI G. & ZAMBOTTI V. -
Determination of Pentoses.
Experientia 2/67/1961.

18- BONTING S.L. & JONES M. -
Determination of Microgram Quantities of Desoxyribonucleic Acid in Tissues Grown in vitro.
Arch. Biochem. Biophys. 66/340/1957.

19- BRADY T.G. , Mc EVOY-BOWE E. -
Application of the Dische diphenylamine reaction to pyrimidine deoxynucleosides.
Nature 168/299/1951.

20- BREDERECK H. -
Die Ringstruktur der Ribose in der Hefe Nucleinsaüre (Vorlaüfig. Mitteil.)
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 66/198/1933.

21- BRIGGS A.P. -
A modification of the Bell-Doisy phosphate method.
J. Biol. Chem. 53/13/1922.

22- BRODY S. -
A spectrophotometric study on the deoxypentose nucleic acid cysteine reaction.
Acta Chem. Scand. 7/502/1953.

23- BROWN D.M. & LYTHGOE B. -
Deoxuribonucleosides and related compounds. Part II. A proof of the furanose structure of the natural 2 - Deoxyribonucleosides.
J. Chem. Soc. 1950/1990.

24- BROWN D.M., HEPPEL L.A. & HILMOE R.J. -
Nucleotides. Part XXIV. The action of some nucleases on simple esters of monoribonucleotides.
J. Chem. Soc. 1954/40.

25- BROWN D.M. & TODD A.R. -
Nucleotides. Part X. Some observations on the structure and chemical behaviour of the nucleic acids.
J. Chem. Soc. 1952/52.

26- BURTON K. -
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 62/315/1956.

27- BUTLER J.A.V., CONWAY B.E. & JAMES D.W.F. -
The effect of salts on polyelectrolytic interactions, with special reference to deoxyribonucleic acid.
Trans.Far. Soc. 50/612/1954.

28- CERIOTTI G. -
A microchemical determination of deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 198/297/1952.

29- CERIOTTI G. -
Determination of nucleic acids in animal tissues.
J. Biol. Chem. 214/5970/1955.

30- CHARGAFF E. & ZAMENHOF S. -
The isolation of highly polymerized deoxypentose nucleic acid from yeast cells.
J. Biol. Chem. 173/327/1948.

31- CHARGAFF E., ZAMENHOF S., BRAWERMAN G. & KERIN L. -
Bacterial deoxypentose nucleic acid of unusual composition.
J. Am. Chem. Soc. 72/3825/1950.

32- CHARGAFF E., MAGASANIK B., VISCHER E., GREEN C., DOMINGER R. & ELSON D. -
Nucleotide composition of pentose nucleic acids from yeast and mammalian tissues.
J. Biol. Chem. 186/[illegible]51/1950.

33- COHEN S.S. -
Observations on the estimation of deoxyribose nucleic acid.
J. Biol. Chem. 156/691/1944

34- COHN W.E. & DOHERTY D.G. -
The catalytic hydrogenation of pyrimidine nucleosides and nucleotides and the isolation of their ribose and respective ribose phosphates.
J. Am. Chem. Soc. 78/2863/1956.

35- COHN W.E. & VOLKIN E. -
Nucleoside-5'-phosphates from Ribonucleic acid.
Nature 167/483/1951.

36- COHN W.E. & VOLKIN E. -
On the Structure of Ribonucleic Acids. I- Degradation with snake venom diesterase and the isolation of pyrimidine diphosphates.
J. Biol. Chem. 203/319/1953.

37- CORI G.T. & CORI C.F. -
The enzymatic conversion of phosphorylase a to b.
J. Biol. Chem. 158/321/1945.

38- DAVIDSON J.N. & WAYMOUTH C. -
Ribonucleic acids and nucleotides in embryonic and adult tissues.
Biochem. J. 38/39/1944.

39- DAY E.D. & MOSCHER W.A. -
An improved colorimetric method for the quantitative estimation of thymine.
J. Biol. Chem. 197/227/1952.

40- DEKKER C.A., MICHELSON A.M. & TODD A.R. -
Nucleotides. Part XIX - Pyrimidine deoxyribonucleoside diphosphates.
J. Chem. Soc. 1953/947.

41- DELSAL J.L. & MANHOURI H. -
Etudes comparatives des dosages colorimétriques du phosphore.
Bull. Soc. Chim. Biol. 37/1041/1955 40/1169/1179/1623 - 1958.

42- DERIAZ R.E., STACEY M., TEECE E.G. & WIGGINS L.F.
Deoxy-sugars. Part I. The Dische Reaction for 2-Deoxypentoses.
J. Chem. Soc. 1949/1222.

43- Di MAYORCA G.A., EDDY B.E., STEWART S.E., HUNTER N.S., FRIEND C. & BENDICH A.
Isolation of infectious deoxyribonucleic acid from S.E. polyoma infected tissue cultures.
Proc. Nat. Acad. Sc. 45/1805/1959.

44- DISCHE Z. & SCHWARZ K. -
Mikromethode zur Bestimmung verschiedener Pentosen nebeneinander bei gegenwart von Hexosen.
Mikrochemie Acta 2/13/1937.

45- DISCHE Z. -
Two characteristic and sensitive color reactions between sulfhydryl compounds and thymonucleic acid.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 55/217/1944.

46- DISCHE Z. -
Color reaction of nucleic acid components.
In "The Nucleic Acids" - Vol. I p. 285 - Ed. by CHARGAFF E. and DAVIDSON J.N.
Acad. Press. New York 1955.

47- DISCHE Z. & BORENFREUND E. -
A new color reaction for the determination of aldopentose in presence of other saccharides.
Bioch. Biophys. Acta. 23/639/1957.

48- DOTY P., BOEDTKER H., FRESCO J.R., HASELKORN R. & LITT M. -
Secondary structure in ribonucleic acids.
Proc. Nat. Acad. Sci. 45/482/1959.

49- DOUNCE A.L., SIMMONS N.S. & KAY E.R.M. -
An improved method for preparing socium deoxypentose nucleate.
Fed. Proc. 10/177/1951.

50-DRURY H.F. -
Identification and estimation of pentoses in the presence of glucose.
Arch. Biochem. 19/455/1948.

51- DRYER R.C., TAMMES A.R. & ROUTH J.J. -
The determination of phosphorus and phosphatase with N-phenyl-phenylene diamine.
J. Biol. Chem. 225/177/1957.

52- DUTTA S.K., JONES A.S. & STACEY M. -
The separation of deoxypentose nucleic acids and pentose nucleic acids.
Biochim. Biophys. Acta. 10/613/1953.

53- EDSTRÖM J.E. -
Composition of Ribonucleic Acid from various parts of Spider oocytes.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 8/47/1960.

54- ELMORE D.V. & TODD A.R. -
Nucleotides. Part XVIII. The synthesis of adenosine-5' uridine-5' phosphate.
J. Chem. Soc. 1952/3681.

55- ELSON D. & CHARGAFF E.
Evidence of common regularities in the composition of pentose nucleic acids.
Biochim. Biophys. Acta. 17/367/1955.

56- EMMANUEL C.F. & CHAIKOFF I.L. -
The large scale preparation of sodium deoxyribonucleate from ripe salmon testes.
J. Biol. Chem. 203/167/1953.

57- EMMANUEL C.F. & CHAIKOFF I.L. -
Spectrophotometric procedure for the analysis of nucleic acid purines and pyrimidines and its application to fish sperm nucleic acids.
Biochim. Biophys. Acta. 28/550/1958.

58- EULER (von) H. & HAHN L. -
A new method for the determination of ribonucleic acid in animal tissue.
Svensk. Kem. Tidskr. 58/251/1946.

59- FABRE R., TRUHAUT R. & BOUDENE Cl. -
Intérêt de l'enrichissement préalable dans l'application des méthodes physiques au dosage des métaux toxiques dans les milieux biologiques (cas du cadmium et du plomb).
Journal de Médecine de Bordeaux et du Sud-Ouest 5/764/1957.

60- FINAMORE F.J. & VOLKIN E. -
Some chemical characteristics of amphibian egg ribonucleic acids.
J. Biol. Chem. 236/443/1961.

61- FISKE C.H. & SUBBA ROW Y. -
The colorimetric determination of phorphorus.
J. Biol. Chem. 66/375/1925.

62- FLETCHER W.E., GULLAND J.M. & JORDAN D.O. -
The constitution of yeast ribonucleic acid. Part VIII. Electrometric titration of the acid groups.
J. Chem. Soc. 1944/33.

63- FLEURY P.& EBERHARD R. -
Recherches sur le dosage des protéines par la méthode photométrique au biuret selon la technique de Gornall.
Ann. Biol. Clin. 9/453/1951.

64- FRAENKEL-CONRAT H. -
The role of nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus.
J. Am. Chem. Soc. 78/882/1956.

65- FRANKLIN R.E. & GOSLING R.G. -
Evidence for 2 chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate.
Nature 172/156/1953.

66- FRESCO J.R., ALBERTS B.M. & DOTY P. -
Some molecular details of the secondary structure of ribonucleic acid.
Nature 188/98/1960.

67- FRICK G. -
A study of the preparation of thymus nucleic acid according to Gulland and all.
Biochem. Biophys. Acta. 13/41/1954.

68- FRICK G. -
A critical study of some commonly used methods of preparating deoxyribonucleate.
Biochem. Biophys. Acta. 13/374/1954.

69- FULLER W. -
Two stranted helical configurations for ribonucleic acids.
J. Mol. Biol. 3/175/1961.

70- FURBERG S. -
An X-ray study of the stereochemistry of the nucleosides.
Acta Chem. Scand. 4/751/1950.

71- FURTH J.J., HURWITZ J. & GOLDMANN M. -
The directing role of DNA in RNA synthesis
Biochem. Biophys. Res. Comm. 4/362/I96I.

72- GARY N.D. & KLAUSMEIER R.E. -
Colorimetric determination of ribose, deoxyribose and nucleic acid with anthrone.
Anal. Chem 26/I958/I954.

73- GEORGIEV G.P. -
A rapid method for the isolation of highly polymerized deoxyribonucleic acid.
Biokhimia 24/472/I959.

74- GERBER P.
An infectious deoxyribonucleic acid derived from vacuolating virus (SV 40).
Virology I6/96/I962.

75- GIERER A., & SCHRAMM G. -
Infectioness of nucleic acid from tobacco mosaic virus.
Z. Naturforsh. IIb/I38/I956.

76- GIERER A. & SCHRAMM G. -
Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus.
Nature I77/702/I956.

77- GROSSMAN L. & GREENLEES J.-
A colorimetric determination of purine and pyrimidine deoxyrinonucleosides and their phosphorylated derivatives.
Anal. Biochem. 2/I89/I96I.

78- GULLAND J.M. & JACKSON E.M. -
The constitution of Yeast nucleic acid.
J. Chem. Soc. I938/I492.

79- GULLAND J.M., JORDAN D.O. & THRELFALL C.J. -
Deoxypentose nucleic acids.
Part I - Preparation of the tetrasodium salt of the deoxypentosenucleic acid of calf thymus.
J. Chem. Soc. I947/II29.

80- GULLAND J.M., JORDAN D.O. & TAYLOR H.F.W. -
Deoxypentose Nucleic Acids.
Part II - Electrometric titration of the acidic and the basic groups of the deoxypentose nucleic acid of calf thymus.
J. Chem. Soc. I947/II3I.

8I- HAAVALDSEN L., LALAND S., Mc KINLEY, Mc KEY J. & ROTH E. -
The isolation and the estimation of the sugar of pyrimidine nucleosides and nucleotides after reduction.
Biochem. Biophys. Acta 33/20I/I959.

82- HAHN L. & VON EULER H. -
Eine neue Method zür Bestimmung von Ribonukleinsaüre in Anwesenheit von Desoxyribonukleinsaüre.
Ark. F. Kem. Miner. Geol. 22/1/1946.

83- HALL B.D. & DOTY P. -
The preparation and physical chemical properties of RNA from microsomal particles.
J. Mol. Biol. 1/III/1959.

84- HITCHINGS G.H. -
The estimation of guanine and xanthine.
J. Biol. Chem. 139/843/1941.

85- HOOPER C.W., WILKINS M.H.F., BARCLAY R.K. & HAMILTON L.D. -
Molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein.
Nature 175/834/1955.

86- HORECKER B.L., SMYRNIOTIS P.Z. & SEEGMILLER J.E. -
The Enzymatic conversion of 6-phosphogluconate to ribulose-5-phosphate and ribose-5-phosphate.
J. Biol. Chem. 193/383/1951.

87- HUNTER G. -
A test for thymine with observations on the keto-enolic type of diazo-test.
Biochem. J. 30/745/1936.

88- HURWITZ J., BRESLER A.E. & DIRINCER R. -
The enzymic incorporation of Ribonucleotides into polyribonucleotides and the effect of DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 3/15/1960.

89- HUTCHISON W.C. & MUNRO H.N. -
The determination of Nucleic Acids in Biological materials.
The Analyst. 86/768/1961.

90- IBSEN K.H., COE E.L. & Mc KEE R.W. -
Interrelationships of metabolic pathways in the ehrlich ascites carcinoma cells.
Biochim. Biophys. Acta 30/384/1958.

91- ISHINARA H. -
Determination of pyrimidine ribonucleosides and nucleotides with the orcinol reaction.
Anal. Biochem. 3/186/1962.

92- ITO Y. -
A tumor producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottentail rabbits.
Virology 12/596/1960.

93- KAY E.R.M., SIMMONS N.S. & DOUNCE A.L. -
An improved preparation of sodium deoxyribonucleate.
J. Amer. Chem. Soc. 74/1724/1952.

94- KAY E.R.M. & DOUNCE A.L. -
Preparation of sodium ribonucleate with use of sodium dodecyl sulfate
J. Amer. Chem. Soc. 75/4041/1953.

95- KECK K. -
An ultramicrotechnique of the determination of deoxypentose nucleic acid.
Arch. Bicchem. Biophys. 63/446/1956.

96- KENT P.W. -
Direct isolation of D-Deoxyribose by mercaptanolysis of calf thymus deoxyribonucleic acid.
Nature 166/442/1950.

97- KERR S.E. & SERAIDARIAN K. -
The separation of purine nucleosides from free purines and the determination of the purines and ribose in these fractions.
J. Biol. Chem. 159/2II/I945.

98- KIRBY K.S. -
A new method for isolation of DNA - Evidence on the nature of bounds between DNA and proteins.
Biochem. J. 66/495/1957.

99- KIRBY K.S. -
The preparation of DNA by the p-aminosalicylate phenol method.
Biochim. Biophys. Acta 36/117/1959.

I00- KISSANE J.M. & ROBINS E. -
The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system.
J. Biol. Chem. 233/184/1958.

I0I- KIT S. -
Base composition of the ribonucleic acids of normal tissues, tumors and tissue subfractions.
Arch. Biochem. Biophys. 88/1/1960.

I02- KRAKOW J.S., KAMMEN H.O. & CANELLAKIS E.S. -
The incorporation of ribonucleotides into terminal positions of deoxyribonucleic acid.
Biochim. Biophys. Acta 53/52/1961.

I03- LAMONTHEZIE N. & PAOLETTI C. -
Utilisation du phénol en vue de l'extraction des acides désoxyribonucléiques (en préparation).

I04- LANE B.G. & BUTLER G.C. -
The exceptional resistance of certain oligoribonucleotides to alkaline degradation.
Biochim. Biophys. Acta 33/281/1959

I05- LASKOV R., MARGOLIASH E., LITTAUER U.Z. & EISENBERG H. -
High molecular weight ribonucleic acid from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 33/247/1959.

I06- LEE W.A. & PEACOCKE A.R. -
Electrometric titration of the sodium salts of deoxyribonucleic acids
Part. I.
J. Chem. Soc. 1951/3361.

I07- LEVENE P.A. & SIMMS H.S. -
The dissociation constants of plant nucleotides and nucleosides and
their relation to nucleic acid structure.
J. Biol. Chem. 65/519/1925.

I08- LEVENE P.A. & TIPSON R.S. -
The ring structure of uridine.
J. Biol. Chem. 101/529/1933.

I09- LEVENE P.A. & TIPSON R.S. -
N-methyl uridine and its bearing on the structure of uridine.
J. Biol. Chem. 104/385/1934.

II0- LIPSETT M.N. -
Evidence for helical structure in polyuridylic acid.
Proc. Nat. Acad. Sc. 46/445/1960.

III- LORING H.S., CARPENTER F.H. & ROLL P.M. -
The hydrolysis of Yeast Ribonucleic Acid by Ribonuclease
I - The extent of hydrolysis and the preparation of ribonucleinase
resistant fractions after ribonucleinase treatment.
J. Biol. Chem. 169/601/1947.

II2- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., PARRAND A.L. & RANDALL R.J. -
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193/263/1951.

II3- LYTHGOE B., SMITH H. & TODD A.R. -
Experiments on the synthesis of purine nucleosides
Part XVI - 9-bêta-d-mannopyranosidoadenine. A proof of the location of
the sugar residue in adenosine.
J. Chem. Soc. 1947/355.

II4- Mc CARTY M. & AVERY O.T. -
Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation
of pneumococcal types
III - An improved method for the isolation of the transforming
substance and its application to pneumococcus types II, III and VI
J. Exptl. Med. 83/97/1946.

II5- Mc RARY W.L. & SLATTERY M.C. -
The colorimetric determination of pentoses and pentosans.
Arch. Biochem. 6/15I/1945.

116- MAGASANIK B -
Isolation and composition of the pentose nucleic acids and of the corresponding nucleoproteins.
In the "Nucleic Acids" - Ed. by CHARGAFF and DAVIDSON.
Vol I p. 397 Acad. Press New York 1955.

117- MARKHAM R. & SMITH J.D. -
The structure of Ribonucleic Acids.
1 - Cyclic nucleotides produced by ribonuclease and by alkaline hydrolysis.
Biochem. J. 52/552/1952.

118- MARKO A.M. & BUTLER G.C. -
The isolation of sodium deoxyribonucleate with sodium dodecyl sulfate
J. Biol. Chem. 190/165/1951.

119- MASSART L. & HOSTE J. -
Le dosage photometrique des nucleosides puriques et pyrimidiques au moyen de la reaction à l'orcine.
Biochim. Biophys. Acta. 1/83/1947.

120- MEJBAUM W. -
Uber die Bestimmung Kleiner Pentoseneugen insbesondere in Derivaten der Ademylsaüre.
Z. Physiol. Chem. 258/117/1939.

121- MERRIFIELD R.B. & WOOLEY D.W. -
The structure and microbiological activity of some dinucleotides isolated from Yeast ribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 197/521/1952.

122- MEYER F., MACKAL R., TAO M. & EVANS E. -
Infectious deoxyribonucleic acid from bacteriophage.
J. Biol. Chem. 236/1141/1961.

123- MILTZER W.E. -
Note on the orcinol reagent.
Arch. Biochem. 9/85/1946.

124- MILLER G.L., GOLDER R.H. & MILLER E.E. -
Determination of pentoses - Effect of varying proportions of components of Bial's color reagent.
Anal. Chem. 23/903/1951.

125- MILLER H.K. -
The microbiological assay of nucleic acids and their derivatives.
In "Methods for Biochemical Analysis" - Ed. by D. GLICK Inter science New-York 1958.
Vol. V1 p. 31.

126- MOULE Y. -
Etude des acides nucléiques et de certains dérivés organiques et inorganiques du phosphore dans les tissus animaux.
Arch. Sci. Physiol. 7/161/1953.

I27- NIGON V. & DAILLIE J. -
La synthèse de l'acide desoxyribonucleique au cours du développement de la drosophile.
Biochim. Biophys. Acta 29/246/1958.

128- OCHOA S., BURMA D.P., KROGER H. & WEILL J.D. -
Deoxyribonucleic acid dependent incorporation of nucleotides from nucleosides triphosphate into ribonucleic acid.
Proc. Nat. Acad. Sc. 47/670/1961.

129- OGUR M. & ROSEN G. -
The nucleic acids of plant tissues
I - The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid.
Arch. Biochem. 25/262/1950.

130- PAEGE L.M. & SCHLENK F. -
Pyrimidine riboside metabolism.
Arch. Biochem. 28/348/1950.

13I- PAOLETTI C., TRUHAUT R. & collaborateurs. -
Nucléoprotéines, Acides Nucléiques et Nucléases dans les Tissus Animaux
In "Technique de laboratoire" - Masson, Paris.
Ed. by LOISELEUR (à paraître).

132- PAOLETTI C., AUBIN G., CHENAILLE P. & LAMONTHEZIE N.
Préparation de l'ADN par action directe de la papaïne sur les tissus.
(En préparation.)

133- PIRCIO A. & CERECEDO L.R. -
Colorimetric determination of the pyrimidine content of the deoxyribonucleic acids of thymus and fish sperm.
Arch. Biochem. 26/209/1950.

134- POTTER J.L. & DOUNCE A.L. -
Nucleotide-aminoacid complexes in alkaline digests of ribonucleic acid.
J. Am. Chem. Soc. 78/3078/1956.

135- ROBERTS D. & FRIEDKIN M. -
The fluorometric determination of thymine in deoxyribonucleic acid and derivatives.
J. Biol. Chem. 233/483/1958.

136- ROE J.H. & RICE E.W. -
A photometric method for the determination of free pentoses in animal tissues.
J. Biol. Chem. 173/507/1948.

137- ROMIG W. -
Infection of Bacillus subtilis with phenol extracted bacteriophage.
Virology 16/452/1962.

138- SASLAW L.D. & WARAVDEKAR V.S. -
Differential colorimetric analysis of some deoxyribosyl compounds.
Arch. Biochem. Biophys. 90/239/1960.

139- SCHLENK F. -
Identification of the carbohydrate group in the nicotinamide nucleotides.
J. Biol. Chem. 146/619/1942.

140- SCHLENK F. & WALDVOGEL M.J. -
Studies on the metabolism of some ribose derivatives.
Arch. Biochem. 12/181/1947.

141- SCHMIDT G. & THANNHAUSER S.J. -
A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues.
J. Biol. Chem. 161/83/1945.

142- SCHMIDT G., CUBILES R., SWARTZ B.M. & THANNHAUSER S.J. -
The action of ribonuclease on yeast nucleic acids.
J. Biol. Chem. 170/759/1947.

143- SCHNEIDER W.C. -
Phosphorus compounds in animal tissues.
I - Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid.
J. Biol. Chem. 161/293/1945.

144- SCHWANDER H. & SIGNER R. -
Darstellung von Hochmolekularen Natrium Thymonucleinat aus Kalbsthymus
Helv. Chim. Acta 33/1521/1950.

145- SEKIGUCHI M., TAKETO A. & TAKAGI Y. -
An infective deoxyribonucleic acid from bacteriophage φ X I74
Biochim. Biophys. Acta 45/199/1960.

146- SEVAG M.G., LACKMAN D.B. & SMOLENS J. -
The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form.
J. Biol. Chem. 124/425/1938.

147- SHAO CHIA CHOU & GOLSTEIN A. -
Chromogenic groupings the owry protein determination
Biochem. J. 75/109/1960.

148- SHINOWARA G.Y., JONES L.M. & REINHART H.L. -
The estimation of serum in organic phosphata and"acid" and "alcaline" phosphatase activity.
J. Biol. Chem. 142/921/1942.

149- SIGNER R. & SCHWANDER H. -
Isolierung Hoch molekularen Nucleisaüre aus Kalbsthymus
Helv. Chim. Acta 32/853/1949.

150- SIMMONS N.S., CHAVOS S. & ORBACH H.K. -
Ten hours preparation of pure highly polymerized thymus nucleic acid.
Fed. Proc. 11/390/1952.

151- SMITH J.D. & WYATT G.R. -
The composition of some microbial deoxypentose nucleic acids.
Biochem. J. 49/144/1951.

152- SMITH J.O. & DUNN D.B. -
An additional sugar component of ribonucleic acids
Biochim. Biophys. Acta 31/573/1958.

153- SOLOMON J.B. -
Increase of deoxyribonucleic acid and cell number during morphogenesis of the early chick embryo
Biochim. Biophys. Acta 23/24/1957.

154- SOODAK M., PIRCIO A. & CERECEDO L.R. -
A colorimetric method for the estimation of uracil and cytosine
J. Biol. Chem. 181/713/1949.

155- SPIRIN A.S., BELOZERSKY A.N. & SHUGEAVA N.V. -
Species specificity of bacterial nucleic acids
Biokhimiya 22/744/1957.

156- STACEY M., DERIAZ R.E., TEEGE E.G. & WIGGINS L.F. -
Chemistry of the Feulgen and Dische nucleal reactions
Nature 157/740/1946.

157- STARON T., ALLARD C. & CHAMBRE M.M. -
Une nouvelle méthode de dosage du désoxyribose; son application au dosage de l'acide désoxyribonucleique
C.R. Acad. Sci. 254/765/1962.

158- STARON T., NGUYEN DAT XUONG, ALLARD C. & CHAMBRE M.M. -
Une nouvelle méthode de dosage des pentoses et de l'acide ribonucleique.
C.R. Acad. Sci. 254/3048/1962.

159- STARON T., NGUYEN DAT XUONG, ALLARD C. & CHAMBRE M.M. -
Quelques données nouvelles sur l'extraction trichloracétique et le dosage des acides nucléiques
C.R. Acad. Sci. 254/3140/1962.

160- STEELE R.S., SFORTUNATO T. & OTTOLENGHI L. -
A micromethod for the determination of the nucleic acids.
J. Biol. Chem. 177/231/1949.

161- STEVENS A. -
Incorporation of the adenine ribonucleotide into RNA by cell fractions from E. Coli B.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 3/92/1960.

162- STUMPF P.K. -
A colorimetric method for the determination of deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 169/367/1947.

163- TODD A.R. -
Synthesis in the study of nucleotides
J. Chem. Soc. 1946/647.

164- TRAVAGLINI E.C. & MELONI M.L. -
Extraction and separation of nucleic acids from cesium chloride homogenates of whole cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7/162/1962.

165- TRUHAUT R. -
Les limites tolérables dans les milieux biologiques : aspects analytiques, biochimiques et pharmacologiques.
Jal Officiel de l'Union Internationale de Chimie pure et appliquée 3/205/1961.

166- TRUHAUT R., BOHUON C. & LE TALAER J.Y. -
Microdosage colorimétrique du phosphore. Application au dosage du phosphore nucléique et au dosage du phosphore minéral du sérum.
Ann. Biol. Clin. 10/859/1961.

167- WALLACE J.M. & O.P. Ts'O.P. -
Nucleotide composition of various ribosomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 5/125/1961.

168- WARAVDEKAR V.S. & SASLAW L.D. -
A sensitive colorimetric method for the estimation of 2 deoxysugars with the use of malonaldehyde thiobarbituric acid reaction.
J. Biol. Chem. 234/1945/1959.

169- WATSON J.D. & CRICK F.H.C. -
A structure for deoxyribose nucleic acid
Nature 171/737/1953.

170- WEBB J.M. & LEVY H.B. -
A sensitive method for the determination of deoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms
J. Biol. Chem. 213/107/1955.

171- WEBB J.M. -
A sensitive method for the determination of ribonucleic acid in tissues and microorganisms
J. Biol. Chem. 221/635/1956.

172- WEBB J.M. -
Studies on the determination of total nucleic acids by ultra-violet absorption methods
J. Biol. Chem. 230/1023/1958.

173- WEISS S.B. & NAKAMOTO T. -
Net synthesis of ribonucleic acid with a microbial enzyme requiring deoxyribonucleic acid and four ribonucleoside triphosphates.
J. Biol. Chem. 236/PC 18/1961.

174- WHEELER H.L. & JOHNSON T.B. -
Researches on pyrimidins : on a colortest for uracil and cytosine
J. Biol. Chem. 3/183/1907.

175- WOESE C.R. -
Composition of various ribonucleic acid fractions from micro-organisms of different deoxyribonucleic acid composition.
Nature 189/920/1961.

176- WOODHOUSE D.L. -
A method for the colorimetric micro-estimation of thymine
Biochem. J. 44/185/1949.

177- WOODHOUSE D.L. -
The colorimetric determination of adenine
Arch. Biochem. 25/347/1950.

178- YCAS M. & VINCENT W.S. -
A ribonucleic acid fraction from yeast related in composition to deoxyribonucleic acid.
Proc. Nat. Acad. Sci. 46/804/1960.

179- ZAMENHOF S., BRAWERMAN G. & CHARGAFF E. -
On the deoxypentose nucleic acids from several microorganisms.
Biochim. Biophys. Acta 9/402/1952.

180- ZAMENHOF S. & CHARGAFF E. -
Separation of deoxypentose and pentose nucleic acids
Nature 168/604/1951.

181- ZAMENHOF S., LEIDY G., ALEXANDER H.E., FITZGERALD P.L. & CHARGAFF E. -
Purification of the deoxypentose nucleic acid of Hemophilus Influenzae having transforming activity
Arch. Biochem. Biophys. 40/50/1952.

-=-

TABLE DES MATIERES

Pages

- INTRODUCTION 1

Ière PARTIE - STRUCTURE, EXTRACTION ET ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES 3

A - GENERALITES SUR LA STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES 4

B - GENERALITES SUR LES METHODES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES 21

I - METHODES DE PREPARATION DES ACIDES NUCLEIQUES 22

1°- Préparation des acides désoxyribonucléiques 24

a) Déprotéinisation par les sels 25

b) Déprotéinisation par les détergents 25

c) Déprotéinisation par le chloroforme 25

d) Déprotéinisation par le phénol 26

e) Déprotéinisation par les enzymes protéolytiques . . . 26

2°- Préparation des acides ribonucléiques 27

II - METHODES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES EN VUE DE LEUR DOSAGE . 27

1°- Traitement préliminaire des tissus 28

2°- Principe des méthodes d'extraction 28

a) Technique de SCHNEIDER 28

b) Technique d'OGUR et ROSEN 29

c) Technique de SCHMIDT-THANNHAUSER 29

1- Principe 29

2- Mode opératoire 29

3- Limites d'utilisation de la technique 30

C - GENERALITES SUR LES METHODES D'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES 31

I - ANALYSE CHIMIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES 31

II - ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE 35

1°- Calcul du coefficient 35

2°- Mesure de l'effet hyperchromique 35

III - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE ET ELECTROPHORETIQUE 36

- IIème PARTIE - DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES 37

Chapitre I - METHODES DE DOSAGE COMMUNES A L'ARN ET A L'ADN

GENERALITES 38

1°- Dosage colorimétrique du phosphore nucléique 39

a) Réactifs 39

b) Mode opératoire 40

Minéralisation 40

Coloration 40

c) Obtention de la courbe étalon 41

d) Expression des résultats 41

e) Spécificité de la méthode 42

2°- Dosage spectrophotométrique des acides nucléiques 42

- Dosage des AN d'après leur absorption à 260 millimicrons . . 44

3°- Dosages colorimétriques des bases communes à l'ARN et à l'ADN . 44

a) Détermination colorimétrique de l'adénine 44

Pages

b) Détermination colorimétrique de la guanine 44
c) Détermination colorimétrique de la cytosine 45

Chapitre II - TECHNIQUES PERMETTANT LE DOSAGE SPECIFIQUE DE L'ARN 46

1°- Dosage colorimétrique de l'uracile 46
2°- Dosages colorimétriques du ribose 46
a) Dosage indirect du furfural 46
b) Dosage direct du furfural 48
1- Réactions au phloroglucinol 48
2- Réactions à la cystéine 50
3- Réactions à l'orcinol 52
4- Autres réactions colorées 54

Chapitre III - DOSAGE COLORIMETRIQUE DU RIBOSE, DES RIBONUCLEOTIDES ET DE L'ARN PAR LA REACTION A L'ORCINOL 56
I - PRINCIPE 56
II - REACTIFS 56
III - MODE OPERATOIRE 57
1°- Technique de MOULE 57
2°- Microméthode 58
IV - ETALONNAGE 58
V - SENSIBILITE 60
VI- SPECIFICITE 65

Chapitre IV - TECHNIQUES PERMETTANT LE DOSAGE SPECIFIQUE DE L'ADN 66
1°- Dosage de la thymine 66
2°- Dosage du désoxyribose 67
a) Réaction à la diphénylamine 67
b) Réaction à l'indole 69
c) Réaction à la cystéine 70
d) Autres réactions colorées 70
e) Dosage fluorométrique 71

Chapitre V - DOSAGE COLORIMETRIQUE DES DERIVES A BASE DE DESOXYRIBOSE ET DES ADN - Technique de BURTON 73
I - PRINCIPE 73
II - REACTIFS 73
III - MODE OPERATOIRE 74
1°- Préparation de la solution d'ADN en vue du dosage 74
2°- Mise en oeuvre du dosage 74
IV - ETALONNAGE 74
V - SENSIBILITE 77
VI - SPECIFICITE 77

- IIIème PARTIE - DOSAGE DES IMPURETES A BASE DE RIBOSE ET DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DANS LES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES 80

Chapitre I - DOSAGE DIRECT DE L'ARN DANS L'ADN 83
I - PRINCIPE 83
II - ETUDE DE LA REACTION COLOREE ENTRE L'ADN ET LE PHLOROGLUCINOL 83
1°- Réactifs 84
2°- Mode opératoire 84
3°- Résultats 84
III - ETUDE DE LA REACTION COLOREE ENTRE L'ADN ET L'ORCINOL 87
1°- Technique de MOULE 88

Pages

2°- Technique de CERIOTTI 88
a) Réactifs 91
b) Mode opératoire 91
c) Résultats 91
3°- Microméthode 93

IV- ETUDE DU DOSAGE DIRECT DE L'ARN DANS L'ADN 93
1°- Réaction d'un mélange ARN - ADN, avec l'orcinol 93
a) Mode opératoire 93
b) Résultats 93
2°- Réaction d'un mélange ARN - ADN, avec le phloroglucinol 95
a) Mode opératoire 99
b) Résultats 99

V - MISE EN OEUVRE DU DOSAGE DIRECT DE L'ARN DANS L'ADN 102

Chapitre II - DOSAGE DE L'ARN DANS L'ADN APRES SEPARATION DES DEUX ACIDES NUCLEIQUES . . 103
A - CHOIX D'UNE METHODE D'ENRICHISSEMENT 103
1°- Méthodes de séparation assurant l'intégrité des molécules d'AN . . 104
2°- Méthodes de séparation entraînant la dégradation des molécules d'AN . . 105
B - DOSAGES DE L'ARN DANS L'ADN APRES HYDROLYSE DIFFERENTIELLE . . 106
1°- Principe 106
2°- Réactifs 106
3°- Mode opératoire 107
a) Séparation des deux AN 107
b) Dosage de l'ARN par la réaction à l'orcinol 107
1- Dosage par la technique de MOULE 107
2- Dosage en microméthode 107
c) Dosage de l'ADN par la réaction de BURTON 108
d) Expression des résultats 108
4°- Sensibilité du dosage 111
5°- Spécificité du dosage 111
a) Recherche de l'ADN dans la fraction acido-soluble 112
b) Recherche de l'ARN dans le liquide de lavage du précipité d'AN. 113

- CONCLUSION 116

- BIBLIOGRAPHIE 118

-=-